

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Mattis Jaama

Tiopuriinmetüültransferaasi geneetiliste markerite
ülegenoomne assotsiatsiooniuuring

Juhendajad Lili Milani, Ph.D.

Riin Tamm, M.Sc.

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Farmakogeneetika	6
1.2 Tiopuriinmetüültransferaasi farmakogeneetika	7
1.2.1 Tiopuriinmetüültransferaas.....	7
1.2.1.1 Tiopuriinmetüültransferaasi geen ja valk	8
1.2.1.2 Tiopuriinmetüültransferaasi geeni alleelid	8
1.2.2 Tiopuriinravimid.....	10
1.2.2.1 Tiopuriinravimite metabolism	11
1.2.3 Tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsus	13
1.2.3.1 Tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsuse määramine	13
1.3 Geneetiline varieeruvus.....	14
1.3.1 Ühenukleotiidsed polümorfismid	15
1.4 Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring	16
1.4.1 GWAS-i disain	16
1.4.2 GWAS-i tulemused.....	18
1.4.3 GWAS-i puudused.....	18
2. UURIMUS	20
2.1 Töö eesmärk	20
2.2 Materjalid ja metoodika	20
2.2.1 Valim	20
2.2.2 Genotüpiseerimine.....	20
2.2.3 Kvaliteedikontroll.....	21
2.2.4 Imputeerimine.....	21
2.2.5 Fenotüübi määramine	21
2.3 Tulemused	22
2.4 Arutelu	28
KOKKUVÕTE.....	32
SUMMARY	33
TÄNUAVALDUSED.....	35
KASUTATUD KIRJANDUS.....	36

KASUTATUD VEEBIAADRESSID	45
LISAD	46
LIHTLITSENTS.....	54

KASUTATUD LÜHENDID

6-MMP	6-metüülmerkaptopuriin, <i>6-methylmercaptapurine</i>
6-MP	6-merkaptopuriin, <i>6-mercaptapurine</i>
6-MTG	6-metüültioguaaniin, <i>6-methylthioguanine</i>
6-TG	6-tioguaaniin, <i>6-thioguanine</i>
CR	Edukalt genotüpileeritud markerite protsentuaalne osakaal, <i>Call Rate</i>
dTGTP	Desoksü-6-tioguaanosiin-5'-trifosfaat, <i>deoxy-6-thioguanine 5'-triphosphate</i>
EAF	Efektialleeli sagedus, <i>effect allele frequency</i>
GMPS	Guaanosiin monofosfaadi süntetaas, <i>guanine monophosphate synthetase</i>
GWAS	Ülegenoomne assotsiatsiooniuring, <i>Genome-Wide Association Study</i>
HGP	Inimese Genoomi Projekt, <i>Human Genome Project</i>
HGPRT	Hüpoksantiinguaaniin-fosforibosüültransferaas, <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HWE	Hardy-Weinbergi tasakaal, <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
IMPDH	Inosiinmonofosfaadi dehüdrogenaas, <i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>
LD	Aheldustasakaalutus, <i>Linkage disequilibrium</i>
lincRNA	Pikk mittekodeeriv RNA, <i>long non-coding RNA</i>
MAF	Harvemesineva alleeli sagedus, <i>minor allele frequency</i>
meTIMP	Metüül-6-tioinosiin-5'-monofosfaat, <i>methyl-6-thioinosine 5'-monophosphate</i>
ncRNA	Mittekodeeriv RNA, <i>non-coding RNA</i>
NGS	Uue põlvkonna sekveneerimine, <i>Next-Generation Sequencing</i>
QQ	Kvantiil-kvaniil, <i>quantile-quantile</i>
rs#	Referents SNP-i ID number, <i>reference SNP ID number</i>
SNP	Ühenukleotiidne polümorfism, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SNV	Ühenukleotiidne variant, <i>single nucleotide variant</i>
TGDP	6-tioguaanosiin-5'-difosfaat, <i>6-thioguanine 5'-diphosphate</i>
TGMP	6-tioguaanosiin-5'-monofosfaat, <i>6-thioguanosine 5'-monophosphate</i>
TGTP	6-tioguaanosiin-5'-trifosfaat, <i>6-thioguanine 5'-triphosphate</i>
TIMP	6-tioinosiin-5'-monofosfaat, <i>6-thioinosine 5'-monophosphate</i>
TPMT	Tiopuriinmetüültransferaas, <i>thiopurine methyltransferase</i>
TÜ EGV	Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu
UTR	Mittetransleeriv regioon, <i>untranslated region</i>
VNTR	Varieeruva arvuga tandeemsed kordusjärjestused, <i>variable number tandem repeats</i>

SISSEJUHATUS

Tiopuriinravimid, nagu 6-merkaptopuriin ja 6-tioguaaniin on tsütotoksilised ravimid, mida kasutatakse valdavalt leukeemia ja põletikulise soolehaiguse ravis. Eelmainitud ravimite metabolismis omab võtmerolli tsütoplasma ensüüm tiopuriinmetüültrasferaas (TPMT), mis katalüüsib maksas tiopuriinravimite metüleerimist. Ensüümi aktiivsus on indiviididel varieeruv ning vale ravimiannuse korral võib see põhjustada tõsiseid kõrvalnähte või ebaefektiivset ravi. Seetõttu on oluline enne ravi alustatmist määrata patsiendi ensüümi aktiivsus.

Peamiselt mõjutavad ensüümi aktiivsust mutatsioonid *TPMT* geenis, kuid alati ei lange genotüüp ja oodatav fenotüüp kokku. Seetõttu on põhjust arvata, et TPMT aktiivsust mõjutavad lisaks mutatsioonidele *TPMT* geenis ka teised faktorid, mida seni pole kirjeldatud. Ühe võimalusena kasutatakse fenotüübiga seotud geneetiliste markerite leidmiseks ülegenoomseid assotsiatsiooniuuringuid (*Genome-Wide Association Study*, GWAS).

Käesolev bakalaureusetöö põhineb kahel GWA uuringul. Nende teostamiseks kasutati paralleelselt samade indiviidide proove, milledest TPMT aktiivsuse määramine viidi läbi kahe substraadiga, 6-merkaptopuriini ja 6-tioguaaniiniga. Antud töös on kasutatud 844 Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonori andmeid, kes proovide kogumise ajal ei kasutanud tiopuriinravimeid.

Töö eesmärgiks oli identifitseerida TPMT aktiivsust mõjutavaid geneetilisi markereid ning kahe uuringu tulemuste võrdlemine.

Märksõnad: tiopuriinmetüültrasferaas (TPMT), 6-tioguaaniin, 6-merkaptopuriin, ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (GWAS)

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Farmakogeneetika

Inimeste ravimitaluvus on erinev – ühele indiviidile mõjub ravim tõhusalt, teisele mitte (Schork, 2015). Veelgi enam, ravim võib esile kutsuda tõsiseid kõrvalnähte, mis halvimal juhul lõppevad patsiendi surmaga. Kuigi ravimitööstuses rakendatakse kõikides ravimite tootmise etappides väga täpselt reguleeritud eeskirju, siis individuaalne varieeruvus muudab kõikidele sobiva ravimi (*one size fits all*) disainimise keeruliseks. (Ma ja Lu, 2011)

1950. aastate lõpus kirjeldati esmakordselt inimeste erineva ravimitaluvuse ühe põhjusena geneetilist varieeruvust, kui leiti, et see on vanematelt järglastele päranduv tunnus (Evans jt., 1960). Geneetilise varieeruvuse olulisus leidis veelgi kinnitust, kui kirjeldati, et populatsioonisisene ravimitaluvuse varieeruvus indiviidide vahel on suurem kui ühel inimesel erinevatel ajapunktidel (Vesell, 1989; Kalow jt., 1998). Need kliinilised ja populatsioonipõhised avastused andsid tõuke farmakogeneetika kujunemiseks, mille eesmärk on geneetiliste muutuste ja pärilikkuse mõju uurimine ravimi toimemehhanismidele (Ma ja Lu, 2011).

Farmakogeneetika omakorda jaguneb farmakokineetikaks ja -dünaamikaks. Farmakokineetika iseloomustab ravimi imendumist, jaotumist, metabolismi ja väljutamist organismist. Nende protsesside eest vastutavad peamiselt ravimite transporterid ning metaboliseerivad ensüümid. Farmakodünaamika käsitleb ravimi toimet kehale ning märklaudmehhanisme. Farmakogeneetika kui teadusharu jõudsa esilekerkimisega uuritakse väga detailselt neid protsesse mõjutavaid geene. (Ross jt., 2012)

Ravimite manustamine kutsub organismis esile rakkude diferentseerumist, jagunemist ja/või suremist. Ravimi metabolisimi, biotransformatsiooni ja/või detoksifikatsiooni eest vastutavad põhiliselt ravimeid metaboliseerivad ensüümid. (Rushmore ja Kong, 2002) Need jagatakse kahte rühma: faas I ja faas II ensüümid.

Faas I ravimeid metaboliseerivate ensüümide hulka kuuluvad põhiliselt tsütokroom P450 perekonna ensüümid, millest olulisimad perekonnad on CYP1, CYP2 ja CYP3 (Gardiner ja Begg, 2006). Lisaks kuuluvad faas I metaboliseerijate hulka väiksemad ensüümirühmad, näiteks alkoholdehüdrogenaasid, aldehüüddehüdrogenaasid, esteraasid. Need ensüümid muudavad ravimid organismi jõudmisel aktiivseteks metaboliitideks, modifitseerides kemikaalide funktsionaalseid rühmi, põhiliselt oksüdatsiooni teel. Samas võivad faas I ensüümidel olla ka inaktiveerivad omadused. (Evans ja Relling, 1999)

Faas II ensüümid osalevad ravimite detoksifikatsioonis, et neid lihtsamini organismist väljutada, lisades ravimi aktiivsetele vormidele erinevaid keemilisi rühmi. Faas II ensüümide suurimad rühmad on UDP-glükuronosüültransferaasid, sulfottransferaasid, N-atsetüültransferaasid, glutatiooni S-transferaasid ja mitmed metüültransferaasid, nende hulgas ka TPMT. (Jancova jt., 2010)

Ravimi metabolismi kiiruse järgi jaotatakse inimesed kolme põhilisse gruppi: aeglased, kiired ja ülikiired metaboliseerijad. Aktiivse ravimi manustamisel on kõrvaltoimete tekkimiseks suurim risk aeglastel metaboliseerijatel, kellel on ensüümi aktiivsus vähenenud või hoopis puudub. Nendel indiviididel tuleks vähendada ravimi annust, et vältida toksifikatsiooni. Kiiretele metaboliseerijatele peaks sobima ravimi standarddoos, kuna ensüümi aktiivsus on normaalne. Ülikiirete metaboliseerijate korral tuleb arvestada, et ravim inaktiveeritakse normaalsest kiiremini ning efektiivse ravi tulemuse saavutamiseks tuleb tõsta ravimi annust. (Kirchheiner ja Seeringer, 2007)

Inaktiivse eelravimi manustamisel võib esineda vastupidine efekt – ülikiiretel metaboliseerijatel tekib rohkem ravimi aktiivseid metaboliite ning sellega võivad kaasneda kõrvalnähud. Samas aeglastel metaboliseerijatel muudetakse eelravim aktiivseks sedavõrd aeglaselt, et raviefekt puudub. (American Medical Association, 2011)

Farmakogeneetika rakendamine kliinilises praktikas on abiks personaalmeditsiini edendamisel, näiteks diagnostiliste testide arendamisel, individipõhisel ravimi ning annuse valikul, mõjutades nii ravimi efektiivsust kui ka ohutust (Ross jt., 2012). Eesmärgiks on geneetiliste markerite kaudu identifitseerida riskigruppi kuuluvaid patsiente, kellel ravim põhjustab kõrvaltoimeid või on ebaefektiivne (Johnson, 2003).

Lisaks on juba praegu aktuaalne juhtnõrnide kirjutamine ravimifirmadele, mille korral oleks võimalik juba esimesest ravimiarenduse etapist arvestada geneetilise infoga (Ratner, 2005).

1.2 Tiopuriinmetüültransferaasi farmakogeneetika

1.2.1 Tiopuriinmetüültransferaas

Tiopuriinmetüültransferaas on tsütoplasma ensüüm, mis vahendab aromaatsete ja heterotsükliiliste ühendite metüleerimist, teiste hulgas ka tiopuriinravimite metüülatsiooni (Krynetski jt., 1996). TPMT katalüüsitud metüülatsioon toimub metüülrühma ülekandega S-adenosüül-L-metioniinilt vastavale ühendile. Metüülatsiooni tulemusena tekib 6-merkaptopuriinist 6-metüülmerkaptopuriin ja 6-tioguaaniinist 6-metüültioguaaniin.

Metüülrühma doonorist S-adenosüül-L-metioniinist tekib metüülrühma ülekande järel S-adenosüül-L-homotsüsteiin. (Kröplin jt., 1998; Weinshilboun, 2006)

1.2.1.1 Tiopuriinmetüültransferaasi geen ja valk

Tiopuriinmetüültransferaasi kodeerib *TPMT* geen, mis asub inimese genoomis 6. kromosoomi lühikesel õlal (6p22.3) (Szumlanski jt., 1996). Geeni pikkuseks on 27 000 aluspaari ning see koosneb 10 eksonist, millest 8 kodeerivad valku. Enamikest mRNAdest puudub ekson 2 alternatiivse splaisingu tulemusena (McLeod ja Siva, 2002).

TPMT geeni promootorpiirkond ei sisalda TATA box'i ega CCAAT konsensuslikku elementi, kuid regioon on väga GC rikas (71%), sisaldades mitmeid GC box'e ning teisi võimalikke *cis*-regulatoorseid elemente (Fessing, Krynetski jt., 1998).

TPMT geenil on tuvastatud 4 pseudogeeni. Suurima sarnasusega pseudogeen on 18. kromosoomi pikal õlal (18q21.1), mille avatud lugemisraam on 96% identne 6. kromosoomi *TPMT* cDNA-ga (Lee jt., 1995). 3. kromosoomil asuv pseudogeen on 86% identne ning kaks X kromosoomil asuvat pseudogeeni on 85% identsed *TPMT* geeniga (Salavaggione jt., 2005).

Geenilt kodeeritakse 245-st aminohappest koosnevat valku, mille suuruseks on 28 kDa (Fessing jt., 1998). 2007. aastal avaldati *TPMT* valgu struktuur kompleksis S-adenosüül-L-homotsüsteiiniga (reaktsiooniproduktiga) (Wu jt., 2007). *TPMT* on monomeerne valk, mis voltub omaselt klass I metüültransferaasidele (Schubert jt., 2003). Valgu struktuuri analüüsidest leiti, et suurimat funktsiooni muutust esile kutsuvad polümorfismid põhjustavad molekuliseseid destabiliseerivaid interaktsioone (põhiliselt van der Waalsi jõu mõjul) (Wu jt., 2007).

1.2.1.2 Tiopuriinmetüültransferaasi geeni alleelid

Täna on leitud ja kirjeldatud 43 erinevat mutantset alleeli, millel on erinev mõju *TPMT* aktiivsusele ^[1].

*TPMT*1* on normaalne, metsiktüüpi (*wild-type*) alleel, millelt kodeeritakse mutatsioonideta normaalse aktiivsusega ensüümi (Szumlanski jt., 1996). Ülejäänud alleelid sisaldavad ühte või mitut mutatsiooni/polümorfismi eksonites või intronites. Muutused eksonites põhjustavad valgu normaalsest kiiremat degradatsiooni (Tai jt., 1997) ning ekson-intron piiril toovad kaasa ebakorrekse mRNA splaisingu (Otterness jt., 1997), mõjudes ensüümi aktiivsusele enamasti negatiivselt.

Kõige levinumad mutantsed alleelid kõikides populatsioonides on TPMT*2, TPMT*3A ja TPMT*3C (tabel 1) (Szumlanski jt., 1996), mis moodustavad 80-95% keskmist ja madalat ensüümi aktiivsust põhjustavatest alleelidest (Tai jt., 1996).

Tabel 1. Kõige levinumad mutantsed TPMT alleelid, mis põhjustavad ensüümi aktiivsuse langust.

Alleel	SNP	EAF	Ekson, koodon	AH muutus
TPMT*2	rs1800462	0,01	V ekson, koodon 80	Ala > Pro
TPMT*3A	rs1800460	0,02	VII ekson, koodon 154	Ala > Thr
	rs1142345	0,05	X ekson, koodon 240	Tyr > Cys
TPMT*3B	rs1800460	0,02	VII ekson, koodon 154	Ala > Thr
TPMT*3C	rs1142345	0,05	X ekson, koodon 240	Tyr > Cys

SNP – dbSNP ID; EAF – efektiivse alleeli sagedus populatsioonis; AH – aminohape.

TPMT*2 alleelis on mutatsioon viiendas eksonis, mis toob kaasa aminohappe muutuse (Ala⁸⁰Pro). mRNA ekspressioonitase selle tõttu ei muutu, kuid aminohappe muutus põhjustab ensüümi aktiivsuse vähenemist rohkem kui sada korda võrreldes metsiktüüpi ensüümi aktiivsusega (Krynetski jt., 1995; Tai jt., 1996).

TPMT*3A alleel sisaldab kahte ühenukleotiidset mutatsiooni, seitsmendas ja kümnendas eksonis, põhjustades aminohappelise muutuse mõlemas positsioonis (vastavalt Ala¹⁵⁴Thr ja Tyr²⁴⁰Cys) (Tai jt., 1996). Alleeli heterosügootsel esinemisel on täheldatud enam kui kaheksa kordset ensüümi aktiivsuse langust (Tai jt., 1997). 154. ja 240. koodoni mutatsioonid võivad esineda ka ühekaupa, erinevatel alleelidel. Neid nimetatakse vastavalt TPMT*3B ja TPMT*3C. (Aarbakke, 1995)

Nii TPMT*2 kui ka TPMT*3A alleeli puhul mõjutab ensüümi aktiivsuse langust valgu kiirendatud degradatsioon proteasoomides: normaalse metsiktüüpi valgu bioloogiline poolväärtusaeg on 18 tundi, mõlema mutantse alleeli puhul umbes 15 minutit (Tai jt., 1997).

Kaukaasia populatsioonide seas on TPMT*3A mutantne alleel kõige suurema esinemissagedusega, moodustades 75-86% kõikidest esinevatest mutantsetest alleelidest (Yates jt., 1997). Erinevates populatsioonides on erinevate mutantsete alleelide esinemissagedus erinev, näiteks TPMT*3A on afroameeriklaste seas esindatud ainult 17%. Afroameeriklaste seas on enim levinuid mutantne alleel TPMT*3C. (Hon jt., 1999)

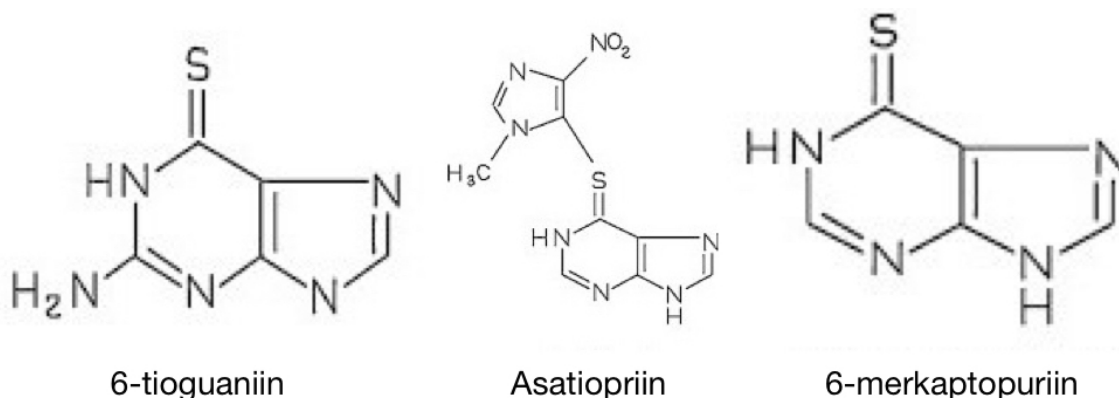
TPMT geeni promootorpiirkonnas, 43 aluspaari kaugusel transkriptsiooni algussaidist 5' suunas on leitud kolmes(*3) kuni üheksas(*9) korduses 17-18 aluspaari pikkuseid varieeruva arvuga tandeemseid kordusjärjestusi (*variable number tandem repeats*, VNTR) (Yan jt.,

2000). Kordusjärjestus sisaldab potentsiaalseid transkriptsioonifaktorite seondumiskohti, sealhulgas Sp1, E2F, KROX24/Zif268 (Krynetski jt., 1997). Kõige enam esineb kordusjärjestusi neljas või viies korduses (Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1999). Uuringud on näidanud, et VNTR-id avaldavad mõju TPMT aktiivsusele. Homosügootset VNTR*5/VNTR*5 ja heterosügootset VNTR*4/VNTR*5 genotüüpi seostatakse keskmisest kõrgema ensüümi aktiivsusega. Genotüübid, kus kordusjärjestusi on rohkem kui viis, on seostatud keskmisest madalama TPMT aktiivsusega. (Alves, 2001) Uuringutes on tuvastatud pöördvõrdeline seos mõlema alleeli kordusjärjestuse summa ja TPMT aktiivsusega punastes vererakkudes (Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998; Alves, 2001).

Kõrge ensüümi aktiivsusega on seostatud ka promootorpiirkonnast leitud trinukleotiidne kordusjärjestus GCC. GCC esinemine heterosügootse genotüübina ühel (5GCC/6GCC) ja teisel patsiendil (7GCC/6GCC) põhjustas väga kõrge TPMT aktiivsuse. Normaalse ensüümi aktiivsusega seostati GCC kordusjärjestuse esinemine kuues korduses. (Roberts jt., 2008)

1.2.2 Tiopuriinravimid

6-tioguaaniin, asatiopriin ja 6-merkaptopuriin (joonis 1) on tsütotoksilised tiopuriinravimid, mida kasutatakse meditsiinis mitmesuguste haiguste raviks. Asatiopriin lagundatakse organismi jõudes kiiresti 6-merkaptopuriiniks (Weinshilboum ja Sladek, 1980). 6-merkaptopuriini kasutatakse ägeda lümfoitse leukeemia (Relling jt., 1999) ning 6-tioguaaniini ägeda müeloidse leukeemia ravis. Asatiopriini manustatakse patsientidele, kes põevad põletikulist soolehaigust või erinevaid autoimmuun- ja sidekoehaigusi. Samuti kasutatakse seda organite siirdamisjärgse äratõukereaktsiooni vältimiseks. (Krynetski ja Evans, 1999)



Joonis 1. Tiopuriinravimite struktuurivalemid (aluseks Fotoohi jt., 2010).

1.2.2.1 Tiopuriinravimite metabolism

On teada, et ravimite tsütotoksiline mõju ehk aktiivsete metaboliitide tekkimise hulk sõltub eelkõige TPMT ensüümi aktiivsusest (Richard jt., 2007).

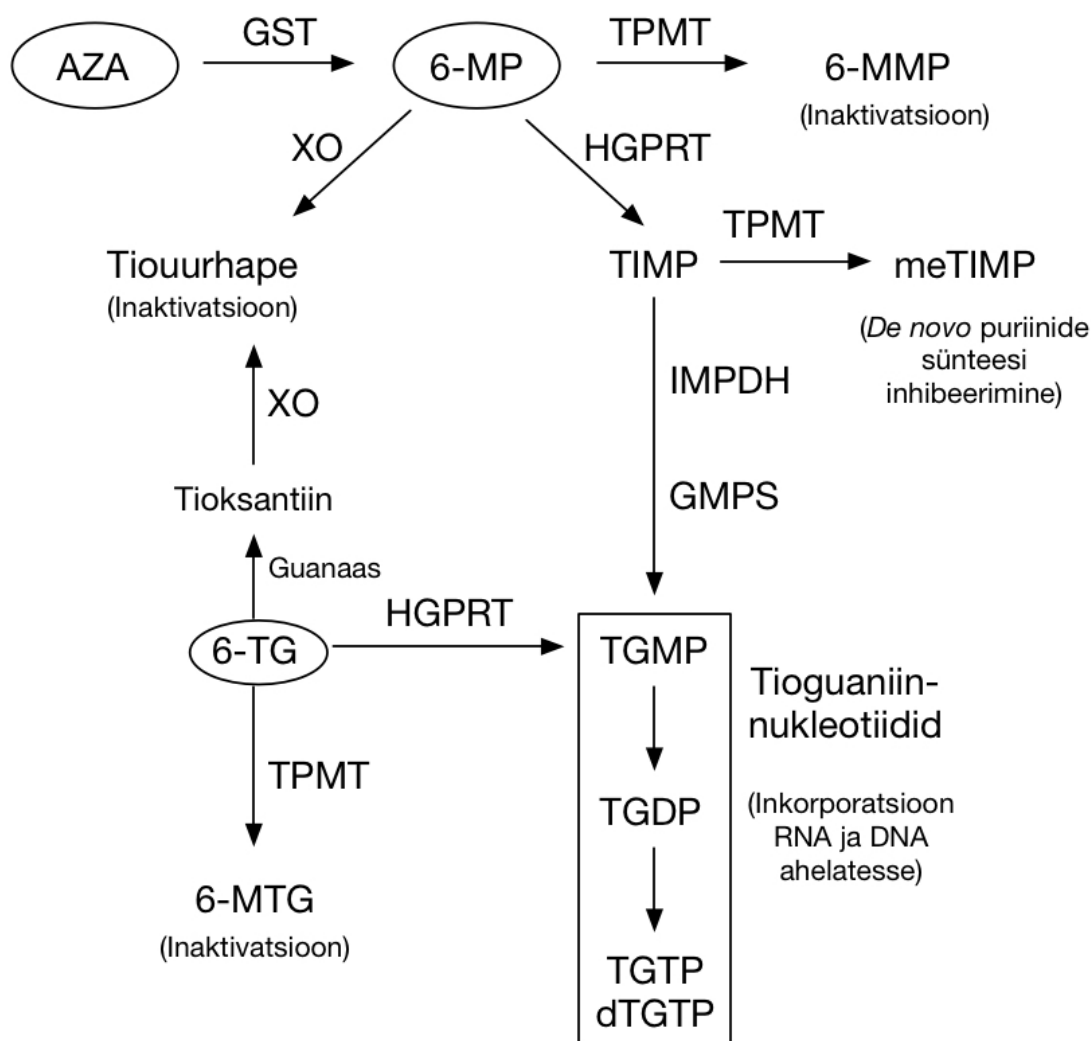
Tiopuriinravimid muudetakse manustamisel rakusiseselt aktiivseteks metaboliitideks, tekivad tioguaniinnukleotiidid. Need seonduvad RNA või DNA ahelasse puriinide asemel, mis peatab rakutsükli ning rakk suunatakse apoptoosi. (Krynetski jt., 1996)

Asatiopriin on 6-merkaptopuriini eelravim, mis konverteeritakse kiiresti maksas ja punastes vererakkudes glutatioon-S-transferaasi poolt 6-merkaptopuriiniks (Schwartz jt., 1958; Odlind jt., 1986). 6-merkaptopuriini edasine metabolism toimub kolme konkureeriva raja kaudu. Ravimi inaktivatsioon toimub ensüümide TPMT ja ksantiinoksüdaas toimel. 6-merkaptopuriin katalüüsitakse ksantiinoksüdaasi poolt tiourhappeks ning TPMT vahendab 6-metüülmerkaptopuriini tekkimist. Mõlemad inaktiivsed metaboliidid väljutatakse organismist uriiniga. (Anglicheau jt., 2002) Inaktiivsete metaboliitide moodustumisel väheneb tioguaniinnukleotiidide teke (joonis 2) (Dervieux jt., 2001).

6-merkaptopuriini aktivatsioon algab 6-tioinosiin-5'-monofosfaadi (*6-thioinosine 5'-monophosphate*, TIMP) moodustumisega hüpoksantiinguaniin-fosforibosüültransferaasi (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, HGPRT) toimel. TIMP muudetakse inosiinmonofosfaadi dehüdrogenaasi (*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) ja guanosiin monofosfaadi süntetaasi (*guanine monophosphate synthetase*, GMPS) abil 6-tioguanosiin-5'-monofosfaadiks (*6-thioguanosine 5'-monophosphate*, TGMP). (Elion, 1989) Lisaks IMPDH ja GMPSi on TIMP substraadiks ka TPMT-le. Metüleerimise tulemusel tekib metüül-6-tioinosiin-5'-monofosfaat (meTIMP), mis fosforibosüülpürofosfaadi-aminotransferaasi inhibeerides vähendab *de novo* puriinide sünteesi (Allan ja Bennett, 1971). Tulemuseks on DNA ja RNA sünteesi aeglustumine, mille tagajärjel aeglustub rakkude kasv ja tekib tsütotoksiline efekt (joonis 2) (Tay jt., 1969).

6-tioguaaniin konverteeritakse HGPRT poolt otse TGMP-ks (De Abreu jt., 1995). TGMP konverteeritakse 6-tioguanosiin-5'-difosfaadiks (*6-thioguanine 5'-diphosphate*, TGDP), millest omakorda saadakse 6-tioguanosiin-5'-trifosfaat (*6-thioguanine 5'-triphosphate*, TGTP) ja desoksü-6-tioguanosiin-5'-trifosfaat (*deoxy-6-thioguanine 5'-triphosphate*, dTGTP), mis seonduvad vastavalt RNA ja DNA ahelatesse (Tidd ja Paterson, 1974). TGMP, TGDP, TGTP ja dTGTP kannavad ühist nimetust tioguaniinnukleotiidid (Lennard, 1992). Nende seondumine DNA ahelasse peatab normaalse rakutsükli, käivitab valepaardumisreparatsioonimehhanismi ja lõpuks apoptoosi (joonis 2) (Swann jt., 1996).

6-tioguaaniini metabolismi alternatiivsed rajad katalüüsivad inaktiivsete metaboliitide teket sarnaselt 6-merkaptopuriinile. Ainus erinevus on 6-tioguaaniini konverteerimisel tiourhappeks, kus esmalt guanaasi abil tekib tioksantiin, seejärel ksantiinoksüdaasi abil tiourrhape. Teine eliminatsiooni rada on metülatsoon TPMT poolt, mille tulemusel tekib 6-metüültioguaaniin. Inaktiivsed metaboliidid eemaldatakse organismist uriiniga (joonis 2). (Kitchen jt., 1999)



Joonis 2. Tiopuriinravimite metabolism. Asatiopriin (AZA) muudetakse organismi jõudes glutatioon-S-transferaasi (GST) poolt 6-merkaptopuriiniks (6-MP). Edasi toimub ksantiinoksüdaasi (XO) ja tiopuriinmetüültransferaasi (TPMT) toimel inaktivatsioon vastavalt tiourhappe ja 6-metüülmerkaptopuriini (6-MMP) moodustumisega või aktivatsioon hüpoksantiinguaniin-fosforibosüültransferaasi (HGPRT), inosiinmonofosfaadi dehüdrogenaasi (IMPDH) ja guanosiin monofosfaadi süntetaasi (GMPS) tulemusel. Moodustuvad tioguaaniinnukleotiidid (TGMP, TGDP, TGTP, dTGTP). Vaheühendist 6-tioinosiin-5'-monofosfaat (TIMP) võib TPMT metülatsooni tulemusel saada metüül-6-tioinosiin-5'-monofosfaat (meTIMP), mis inhibeerib *de novo* puriinide sünteesi. 6-tioguaaniin (6-TG) inaktivatsioon toimub TPMT või guanaasi ja XO toimel. 6-TG aktivatsioon toimub HGPRT abil, moodustades tioguaaniinnukleotiide.

1.2.3 Tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsus

TPMT aktiivsus on individuaalne ning see põhjustab varieeruvust ravimite efektiivsuses ja üldises ravimitaluvuses (Weinshilboum ja Sladek, 1980). Madala ensüümi aktiivsuse korral esineb patsientidel ravimite standarddoosi manustamisel kõrvalnähte, mis võivad olla eluohtlikud (Lennard jt., 1987). Kõrge ensüümi aktiivsuse korral on patsientidel oht haiguse kordumises, kuna ravimi lagundamine toimub kiiremini ja aktiivseid metaboliite tekib vähem (Stanulla jt., 2005).

Populatsioonis esineb TPMT aktiivsus trimodaalselt – 0,3% indiviididel on väga madal, umbes 10% osaliselt vähenenud ning 89% normaalne TPMT aktiivsus (Krynetski jt., 1996).

Seetõttu on oluline enne tiopuriinravimitega ravi alustamist ning annuse määramist tuvastada indiviidi TPMT aktiivsuse tase, et ravi oleks efektiivne ning kulgeks ohutult, kõrvalnähtudeta. Tioguaninnukleotiidide ehk ravimi aktiivsete metaboliitide tekkimise ning TPMT aktiivsuse ehk tiopuriinravimite metüleerimise vahel on pöördvõrdeline seos – mida väiksem on ensüümi aktiivsus, seda rohkem tekib rakkudes tioguaninnukleotiide ja vastupidi (Krynetski jt., 1996).

1.2.3.1 Tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsuse määramine

Fenotüübi määramiseks kasutatakse ensüümi aktiivsuse mõõtmist punastest vererakkudest kõrgsurvevedelikkromatograafiaga (Loit jt., 2011). Ensüümi aktiivsus erütrotsüütides on tugevas korrelatsioonis teiste kudede, eriti maksa, TPMT aktiivsusega (Szumlanski jt., 1992). Fenotüübi määramine erütrotsüütidest on ajamahukas protseduur ning sellel on mitmed piirangud. Patsiendile ei tohi teha vereülekannet 60 päeva enne TPMT aktiivsuse mõõtmist, sest vastasel juhul ei näita määratud ensüümi aktiivsus erütrotsüütides patsiendi enda TPMT aktiivsust. Eriti oluline on see leukeemia patsientide korral, kes saavad tihti vereülekandeid. (Schwab jt., 2001) Lisaks võivad TPMT aktiivsust mõjutada ka teised manustatavad ravimid (Lewis jt., 1997).

TPMT aktiivsuse määramiseks *in vitro* on kasutatud peamiselt kahte substraati. Ühes läbiviidud uuringus võrreldi 199 veredoonori TPMT aktiivsusi, kasutades ühe proovi inkubeerimisel substraadina 6-merkaptopuriini ning teisel 6-tioguaniini. Kõrgsurvevedelikkromatograafiaga määrati metüleeritud metaboliitide hulk proovis. Mõlema substraadi puhul oli ensüümi aktiivsuste jaotus trimodaalne. 6-tioguaniini kasutamisel substraadina oli TPMT aktiivsus keskmiselt 54.4 ühikut ($\text{nmol 6-MTG g}^{-1} \text{Hb h}^{-1}$). 6-merkaptopuriini kasutamisel substraadina oli keskmine TPMT aktiivsus 35.8 ühikut (nmol 6-

MMP $\text{g}^{-1} \text{Hb h}^{-1}$). See näitab 6-tioguaaniini 34% võrra efektiivsemat lagundamist TPMT ensüümi poolt, võrreldes 6-merkaptopuriiniga. (Kröplin ja Iven, 2000)

Alternatiivne võimalus aktiivsuse määramiseks on genotüpiseerimine. Selle eelisteks fenotüübi määramise ees on kiirus ja lihtsus (Karas-Kuzelicki ja Mlinaric-Rascan, 2009). TPMT ensüümi kodeerivas geenis on leitud mitmeid erinevaid eelpool kirjeldatud muutusi, mis mõjutavad valgu struktuuri või koostist. See omakorda muudab valgu eluiga ning ühtlasi TPMT aktiivsust. (Tai jt., 1997) Genotüpiseerimisel on samuti oma nõrgad kohad, sest läbiviidud uuringutes leidub indiviide, kelle *TPMT* geenivariant ei põhjenda ravimitaluvuse erinevust. Ka normaalse genotüübiga patsientidel on esinenud erinevaid tiopuriinravimitest põhjustatud kõrvaltoimeid. (Schwab jt., 2002) Selle põhjal võib eeldada, et TPMT aktiivsust mõjutavad lisaks seni tuvastatud polümorfismidele TPMT geenis ka teised faktorid, mida ei ole veel kirjeldatud (Karas-Kuzelicki ja Mlinaric-Rascan, 2009).

1.3 Geneetiline varieeruvus

1990. aastatel alustati Inimese Genoomi Projekti (*Human Genome Project*, HGP) raames kogu inimese genoomi ehk ligikaudu 3 miljardi aluspaari pikkuse järjestuse sekveneerimist. HGP eesmärgiks oli kogu genoomi kaardistamine ja DNA järjestuse tuvastamine, millega jõuti edukalt lõpule 2003. aastal. Tulemused näitavad, et inimese genoom sisaldab umbes 22 000 geeni ning inimeste DNA järjestused on 99,5% ulatuses identsed. Seega vaid väike osa kogu järjestusest on varieeruv. (Pettersson jt., 2009) Eelnimetatud fakti alusel on võimalik seletada erinevate geneetilist eelsoodumust omavate haiguste arengut ja avaldumist. Selleks kasutatakse sageli juht-kontroll uuringut, kus võrreldakse mingit fenotüüpi omavate ehk haigete ja kontrollgrupi ehk tervete genoomijärjestusi. (Zondervan ja Cardon, 2007)

Esimene inimese genoomi sekveneerimine teostati esimese põlvkonna tehnoloogiat kasutades nn Sangeri meetodil, mis oli äärmiselt kallis ning aeganõudev. Uue põlvkonna sekveneerimise tehnoloogia (*Next-Generation Sequencing*, NGS) kasutuselevõtuga muutus sekveneerimine oluliselt odavamaks ja kiiremaks. NGS tehnoloogia areng andis tõuke 1000 Genoomi Projekti (*1000 Genomes Project*) loomiseks, mille eesmärgiks on kaardistada inimese geneetiline varieerumine, kasutades andmeid mitmetest erinevatest populatsioonidest. Projekti raames identifitseeriti nii ühenukleotiidseid polümorfisme (*single nucleotide polymorphism*, SNP), kui ka struktuurseid variante – insertioone ja deletsioone ehk indeleid, duplikatsioone, translokatsioone ning transversioone. (McGuire, 2008)

Ühenukleotiidsed mutatsioonid ehk punktmutatsioonid jagunevad ühenukleotiidsseteks variantideks (*single nucleotide variant*, SNV), mille sagedus populatsioonis jääb alla viie

protsendi, ning sagedasteks variantideks ehk SNP-ideks, mille puhul harvemesineva alleeli sagedus (*minor allele frequency*, MAF) populatsioonis on >5% (Frazer jt., 2009). Enamik sagedamini esinevaid variatsioone (MAF>5%) ei oma teadaolevalt mingisugust fenotüübilist efekti. (Frazer jt., 2009)

1.3.1 Ühenukleotiidsed polümorfismid

SNP-id moodustuvad inimese kogu geneetilisest varieeruvusest üle 90% (Brookes, 1999). SNP-ide leidmiseks on loodud International HapMap Project ^[2], mille eesmärgiks on kaardistada inimese haplotüübid ning selle kaudu lihtsustada haiguste geneetiliste põhjuste identifitseerimist. (International HapMap Consortium, 2005) Kõik leitud ja kirjeldatud SNP-id kogutakse andmebaasi dbSNP ^[3], kuhu lisatakse ka leitud haruldased SNV-d, millest mõned esinevad ainult ühel inimesel. (Frazer jt., 2009) Viimastel andmetel (seisuga 21.mai 2014) on dbSNP andmebaasi sisestatud 43 737 321 valideeritud ühenukleotiidsset varianti ja polümorfismi ^[4].

Kuna inimese genoomis moodustab valku kodeeriv ala vaid 1,1% kogu DNA järjestusest, siis enamik SNP-idest jääb kodeerivast järjestusest välja. 24% genoomist moodustavad intronid ja regulatoorne ala ning 75% on intergeenne ehk geenidevaheline ala. (Venter jt., 2001) Ühes uuringus näidati, et 98% kõikidest SNP-idest jäävad intergeenssesse alasse ja intronitesse. 5'- ja 3'- mittetransleerivasse piirkonda (*untranslated region*, UTR) jääb ligikaudu 1% SNP-idest. Seega vaid üks protsent kõikidest SNP-idest jääb geenide kodeerivasse alasse, millest omakorda kolmandik põhjustab sünonüümse nukleotiidi asenduse ehk valgu aminohappeline koostis ei muutu. (Tong jt., 2010)

Kui algselt seostati fenotüübiliste muutustega eelkõige valku kodeerivas järjestuses asuvaid polümorfisme, siis viimase kümnendi jooksul populaarsust kogunud ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (*Genome-Wide Association Study*, GWAS) on tõestanud, et ka mittekodeerivas järjestuses asuvad variatsioonid võivad samasugust funktsiooni omada. GWAS-i abil tuvastatud erinevate tunnuste ja haigustega assotsieerunud SNP-idest vaid umbes 7% on valku kodeerivas järjestuses. (Pennisi, 2011) Ülejäänud 93% mittekodeerivas alas asuvad SNP-id annavad alust väita, et geenide regulatsioon toimub juba transkriptsiooni tasemel. Seda on kinnitanud mitmed uuringud, mis on identifitseerinud tugevaid seoseid SNP-ide ja mRNA ekspressiooni vahel erinevates kudedes (Westra jt., 2013; Westra jt., 2015). Samuti on kinnitatud, et mittekodeerivas regioonis asuvad SNP-id mõjutavad mittekodeerivate RNAde (*non-coding RNA*, ncRNA) ekspressiooni, mis omakorda on seotud haigusliku fenotüübiga (Kumar jt., 2013).

1.4 Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring

Ülegenoomseid assotsiatsiooniuuringuid kasutatakse polügeensete komplekshaiguste põhjuste uurimiseks. Vastupidiselt mendeliaalsetele haigustele, näiteks tsüstiline fibroos ja Huntingtoni tõbi, mida põhjustavad mutatsioonid ühes geenis (Hardy ja Singleton, 2009), on komplekshaiguste tekkepõhjuste leidmine keeruline, sest haiguse kujunemisel on oluline mitmete erinevate geenide koosmõju (Manolio, 2010).

GWAS on geneetiliste markerite, üldjuhul SNP-ide ja haiguse vaheliste seoste identifitseerimine ning lõplik eesmärk on markerite tuvastamise abil geneetilise haigusrisi ennustamine. (Bush ja Moore, 2012) Lisaks kasutatakse neid uuringuid ravimvastuse tuvastamiseks ja antopomeetrias (Manolio, 2009). Farmakogeneetikas kasutatakse GWAS-i DNA variatsioonide tuvastamisel, mis on seotud ravimi metabolismi ja efektiivsusega või ravimi kõrvalnähtudega (Daly, 2010).

Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring on väga levinud meetod ning praeguseks on läbi viidud tuhandeid teadustöid, milles on identifitseeritud haiguse või tunnusega assotsieerunud markereid. Uuringute koondamiseks lõi National Human Genome Research Institute (NHGRI) avaliku kataloogi (*Catalog of Published Genome-Wide Association Studies*), kuhu lisatakse käsitsi üle vaadatud uuringud, milles on kasutatud vähemalt 100 000 SNP-i ja assotsiatsioonide statistilise olulisuse väärtus jääb alla 1×10^{-5} . 2014. aastaks sisaldas kataloog 1751 uuringut 11 912 SNP-iga. (Welter jt., 2014)

GWAS sai võimalikuks tänu DNA mikrokiipidele, mis võimaldavad korraga testida üle miljoni SNP-i, millede genotüpiseerimiseks kasutatakse näiteks firmade Illumina^[5] või Affymetrix^[6] poolt toodetud kogu genoomi katvaid kommertsiaalseid kiipe. Assotsiatsiooniuuringu läbiviimisel kasutatakse reeglina vähemalt 100 000 SNP-i, kuid eelistatud on suurema hulga markerite kasutamine. (Pearson ja Manolio, 2008)

Praegu veel ei rakendata uuringutes kogu genoomi sekveneerimist, kuid on üsna tõenäoline, et tehnoloogia arengu ja sekveneerimise odavnemisega teostatakse lähitulevikus enamik uuringuid sekveneeritud genoomidega. (Welter jt., 2014)

1.4.1 GWAS-i disain

GWAS on tavaliselt neljaetapiline uuring:

- 1) suure hulga indiviidide valimine, kuhu kuuluvad haiged või meid huvitavat fenotüüpi omavad indiviidid ning kontrollgrupp tervetest inimestest;

- 2) DNA eraldamine ja genotüpiseerimine, lisaks kogutud andmete kontrolli usaldusväärsuse tagamiseks;
- 3) statisiline test assotsiatsiooni leidmiseks uuritava tunnuse ja markerite vahel;
- 4) tuvastatud seoste kontroll sõltumatus uuringugrupis ehk replikatsioon.

GWAS uuringu puhul jaotuvad fenotüübid kahte erinevasse rühma: binaarsed tunnused (näiteks haige ja terve) ning kvantitatiivsed tunnused (näiteks antud töös kasutatakse TPMT aktiivsust järjestikuse kvantitatiivse fenotüübina). Kvantitatiivse tunnuse kasutamine annab uuringule suurema statistilise võimsuse assotsiatsioonide tuvastamiseks. (Winkler jt., 2014)

Uuringu valimi puhul tuleb arvestada, et populatsioonist oleks individid uuringusse kaasatud juhuslikkuse printsiibil, võimalikult ühtlase sugulise ja vanuselise jaotusega. Samuti tuleb enne uuringu läbiviimist teostada individide vaheline suguluse kontroll. (Turner jt., 2011)

Uuringu disainimisel tuleb olulise faktorina arvestada, et valimi hulk oleks piisavalt suur, saavutamaks statistilist võimsust, mis võimaldab tuvastada assotsieerunud markereid (Winkler jt., 2014).

Enne genotüpiseerimist tuleb otsustada, missugust korrelatsioonikordaja väärtust (r^2) kasutada kaudsel teel kaasnevate [mitte otseselt genotüpiseeritavate SNPide vaid aheldustasakaalutuse (*Linkage disequilibrium*, LD) põhjal ennustatavate] SNP-ide ennustamiseks (Spencer jt., 2009). Korrelatsioonikordaja väärtus on uuringu läbiviija poolt vabalt valitav, kuid tavaliselt määratakse selleks $r^2=0,80$ (Pe'er jt., 2006).

DNA mikrokiibi analüüsid eeldavadki, et osa SNP-e on võimalik tuvastada kaudsel teel. Neid faktoreid arvestades, saab hinnata erinevate kiipide katvust (Barrett ja Cardon, 2006). Kiipide omavaheline erinevus on põhiliselt katvuses ja võimsuses ning hinnas (Spencer jt., 2009).

Imputatsiooni abil võib uuringu statistilist võimsust suurendada igal kiibil, vähendades kiipide omavahelist erinevust ja võimaldades leida rohkem tunnusega assotsieerunud markereid (Spencer jt., 2009).

Imputeerimine on genotüüpide ennustamine, mida pole valimi individidel analüüsitud. Imputeerida võib tervet genoomi või mingit kindlat piirkonda, GWAS-i korral kasutatakse tavaliselt genotüübi imputatsiooni üle kogu genoomi. (Marchini ja Howie, 2010)

Imputatsiooni läbiviimiseks kasutatakse genotüpseeritud andmestikku, mis haplotüpiseeritakse. Seejärel kasutatakse puuduvate markerite tuvastamiseks erinevaid referentshaplotüüpe, mida saab näiteks HapMap2 või 1000 Genoomi Projekti referentspaneelidest. Kasutades uuringus puuduvate markeritega andmestikku võivad olulised assotsiatsioonid jääda tuvastamata. (Marchini ja Howie, 2010)

Imputatsiooni läbiviimiseks võib kasutatada näiteks programmi IMPUTE või IMPUTE2^[7,8], millest teine on uuem ja võimsam versioon, kasutades referentspaneelis tuhandeid

kromosoomide ning saavutades täpsema tulemuse kui ühte referentspaneeli kasutades. (Howie jt., 2009)

1.4.2 GWAS-i tulemused

Assotsiatsioonianalüüsi võib teostada erinevate programmidega, näiteks Marchini jt. (2007) poolt väljatöötatud SNPTEST-iga, mida kasutati ka WTCCC (*Wellcome Trust Case-Control Consortium*) poolt seitsme komplekshaiguse assotsiatsiooniuringus, mille tulemused olid üheks esimeseks edulooks GWA uuringute ajaloos (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007).

SNPTEST programm väljastab uuringu tulemused failina, kuhu on märgitud erinevad väärtused. Nendest olulisemad on SNP-i positsioon kromosoomis, referents SNP-i ID number (*reference SNP ID number*, rs#), p-väärtus, efekti alleel ja referents alleel, harvemesineva alleeli esinemissagedus (MAF). Programmiga R on võimalik SNPTEST-i faili põhjal koostada Manhattani ja kvantiilide (*quantile-quantile*, QQ) joonised, mis väljendavad tulemusi visuaalselt. Manhattani joonise Y-teljel on assotsiatsiooni negatiivne kümnendlogaritm p-väärtusest ja X-teljel genoomne skaala kromosoomide kaupa. QQ joonis visualiseerib mõõdetud assotsiatsioonide p-väärtuste kõrvalekalded nullhüpoteesist. (Ehret, 2010)

1.4.3 GWAS-i puudused

GWAS uuringutesse võib valepositiivseid tulemusi anda populatsiooni stratifikatsioon, mis on põlvnemise erinevusest tulenev kontrollgrupi ja juhtude vaheline alleelisageduste erinevus. Stratifikatsiooni puhul tekib uuringu valimis sisemine struktuur, mis võib takistada õigete, etniliste gruppide üleste assotsiatsioonide leidmist. (Bush ja Moore, 2012) Uuringu valimis oleva struktuuri hindamiseks kasutatakse genoomset kontrolli. Stratifikatsiooni olemasolul saab valimit kohendada vastavalt vajalikule tunnusele ning seega parandada uuringu tulemuste usaldusväärsust. (Price jt., 2010)

Kuigi GWA uuringute abil on tuvastatud väga paljude erinevate komplekshaiguste ja geneetiliste markerite vahelisi assotsiatsioone ning identifitseeritud tuhandeid uusi lookusi ja mitmeid kandidaatgeene, jääb suur osa fenotüübi varieeruvusest sellegipoolest seletamata. Iga üksiku assotsiatsiooni efekt populatsioonisisesele varieeruvusele on väga väike. Näiteks pikkusega seotud 54 tuvastatud lookust defineeris vaid 5% päritavusest, ehk keskmiselt määras üks assotsieerunud marker 0,1% kogu tunnuse varieeruvusest (Visscher, 2008).

Fenotüübi varieeruvust, mida GWAS uuringutega pole suudetud seletada, nimetatakse kadunud pärilikkuseks (*missing heritability*). Arvatakse, et osa sellest on varjatud struktuursete variatsioonide (inversioonide ja translokatsioonide) poolt, mida tavaliste kommertsiaalsete DNA mikrokiipidega määrata ei saa. (Manolio jt., 2009)

2. UURIMUS

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli tuvastada tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsuse varieeruvusega assotsieerunud geneetilisi markereid ning omavahel võrrelda ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute tulemusi.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Valim

Käesoleva töö raames kasutati uuringute (uuring 1 ja uuring 2) läbiviimiseks Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) geenidoonorite proove, mis on kogutud üle Eesti. Proovid valiti TÜ EGV geenidoonorite seast juhuslikult. Kõik uuringutes kasutatud individid on andnud kirjaliku nõusoleku oma proovide ja andmete töötlemiseks ning kasutamiseks, samuti ei ole nad tarvitanud tiopuriinravimeid. Kohordi vanuseline ja sooline jaotus on välja toodud tabelis 2. Uuringute läbiviimiseks on andnud loa Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee.

Tabel 2. Mõlemas uuringus kasutatud individide sooline ja vanuseline jaotus.

	Uuring 1 (substraat 6-TG)		Uuring 2 (substraat 6-MP)	
	Mehed	Naised	Mehed	Naised
Indiviidide arv	414	430	412	428
Vanus	18 - 87	18 - 86	18 - 87	18 - 86
Kokku	844*		840*	

*Uuringutes kasutati samade individide proove (840 proovi kattuvad). Tabelis kajastuvad kvaliteedikontrolli läbinud individide andmed. 6-TG – 6-tioguaaniin; 6-MP – 6-merkaptopuriin.

2.2.2 Genotüüpiseerimine

Indiviidide genoomne DNA eraldati perifeersetest lümfotsüütidest. Proovide genotüüpiseerimine viidi läbi TÜ EGV tuumiklaboris vastavalt tootja protokollile, kasutades Illumina Human370CNV Beadchip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) kiipi, millel on võimalik tuvastada rohkem kui 370 000 genoomset markerit.

2.2.3 Kvaliteedikontroll

Genotüpiseerimise kvaliteedikontroll ja filtreerimine teostati programmidega Illumina GenomeStudio 3.1 ^[5], PLINK 1.07 (Purcell jt., 2007) ja R.

Kvaliteedikontrollis kasutati järgmisi parameetreid:

1. edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal (*Call Rate*, CR) iga SNPi ja indiviidi kohta;
2. heterosügootsus;
3. indiviididevaheline sugulus;
4. harvemesineva alleeli sagedus (MAF);
5. Hardy-Weinbergi tasakaal (*Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE).

Analüüsist jäeti välja individid, kelle CR < 95% ja heterosügootsus oli ebanormaalselt kõrge või madal [väärtusete põhjal, mis ei mahtunud vahemikku $\pm(3 \times \text{standardhälvet})$ keskvaertusest]. Samuti eemaldati individid, kelle sugu ei olnud andmestiku ja genotüübi põhjal vastavuses. Uuringutest jäid välja markerid, mille MAF < 1%, CR < 95% ning HWE täpse testi p-väärtus < 10^{-6} . Samuti eemaldati sugukromosoomide SNP-id. Kvaliteedikontrolli järgselt jäi analüüsidesse 309 389 genotüpiseeritud markerit.

2.2.4 Imputeerimine

Puhastatud genotüpiseeritud andmed imputeeriti programmidega ShapeIT v2 (Howie jt., 2009) ja IMPUTE v2.2.2 (Abecasis jt., 2012), kasutades 1000 Genoomi Projektist pärinevaid referenthaplotüüpe (*1000 Genomes Phase 3, Oct 2014*). Referenspaneel sisaldas 2504 haplotüüpi ^[9]. Imputeerimise järgselt kaasati analüüsi kokku 7 652 694 imputeeritud ja genotüpiseeritud markerit.

2.2.5 Fenotüübi määramine

Assotsiatsioonianalüüsis kasutati mõlemas uuringus fenotüübina kvantitatiivset tunnust – TPMT aktiivsust mõõdetuna kahe erineva substraadiga. Analüüsiks valmistati ette hemolüüs punastest vererakkudest. TPMT aktiivsus mõõdeti mitteradioaktiivse kõrgsurvedelikkromatograafia meetodil (Lennard ja Singleton, 1994). Esimeses uuringus kasutati substraadina 6-tioguaaniini ja teises 6-merkaptopuriini ning registreeriti 6-metüültioguaaniini (6-MTG) ning 6-metüülmerkaptopuriini (6-MMP) moodustumist. Mõlemal juhul kasutati metüülrühma doonorina S-adenosüül-L-metioniini. TPMT aktiivsuse

mõõtmised 6-TG-ga viidi läbi Dr. Margarete Fischer-Bosch Kliinilise Farmakoloogia Instituudis Saksamaal ning 6-MP-ga Ljubljana Ülikooli Kliinilise Biokeemia õppetoolis Sloveenias.

2.3 Tulemused

Käesoleva töö raames identifitseeriti TPMT ensüümi aktiivsuse varieeruvusega seotud geneetilisi markereid. Analüüsis kasutati tulemusi kahest ülegenoomsest assotsiatsiooniuringust. Käesolevas töös kasutatava fenotüübi ehk TPMT aktiivsuse tulemused on tabelis 3.

Tabel 3. Indiviididel mõõdetud TPMT aktiivsus.

	Uuring 1 (substraat 6-TG)	Uuring 2 (substraat 6-MP)
Aktiivsuste vahemik	13-64 (nmol 6-MTG/h/gHb)	12,6-102,5 (nmol 6-MMP/h/gHb)
Keskmine (mediaan)	38,99 (39)	35,48 (34,35)
Standard hälve	7,65	10,43

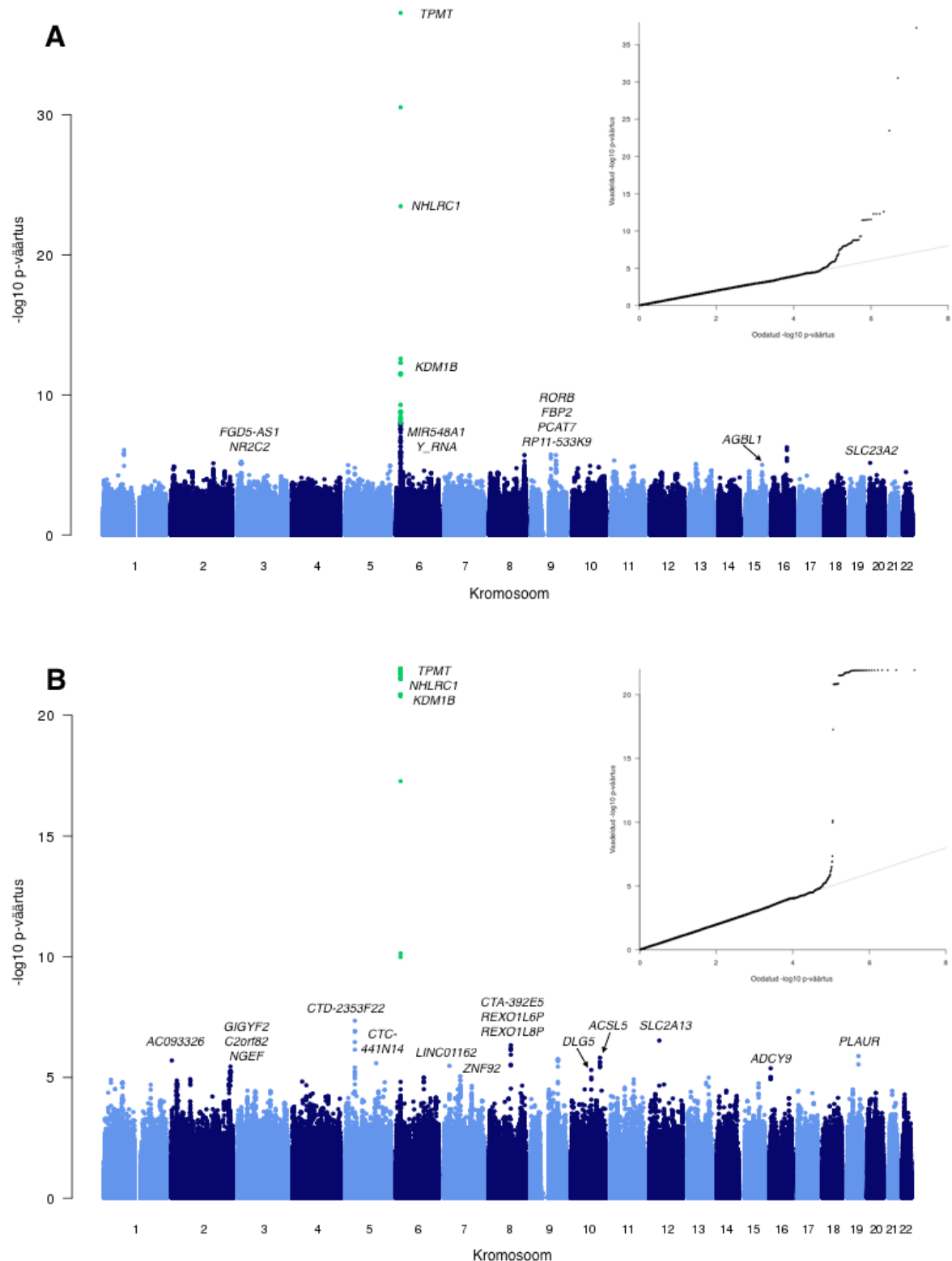
6-TG – 6-tioguaaniin; 6-MP – 6-merkaptopuriin; 6-MTG/h/gHb – tekkinud 6-metüültioguaaniini ühes tunnis ühe grammi hemoglobiini kohta; 6-MMP/h/gHb – tekkinud 6-metüülmerkaptopuriini ühes tunnis ühe grammi hemoglobiini kohta.

Analüüsi käigus identifitseeritud markerite üldjaotus on tabelis 4. Tulemustes on välja toodud andmed assotsieerunud markerite kohta, mille statistilise olulisuse väärtus on $p < 1 \times 10^{-6}$ ja imputeeritud markerite skoor on $> 0,9$.

Tabel 4. Assotsieerunud markerite üldjaotus.

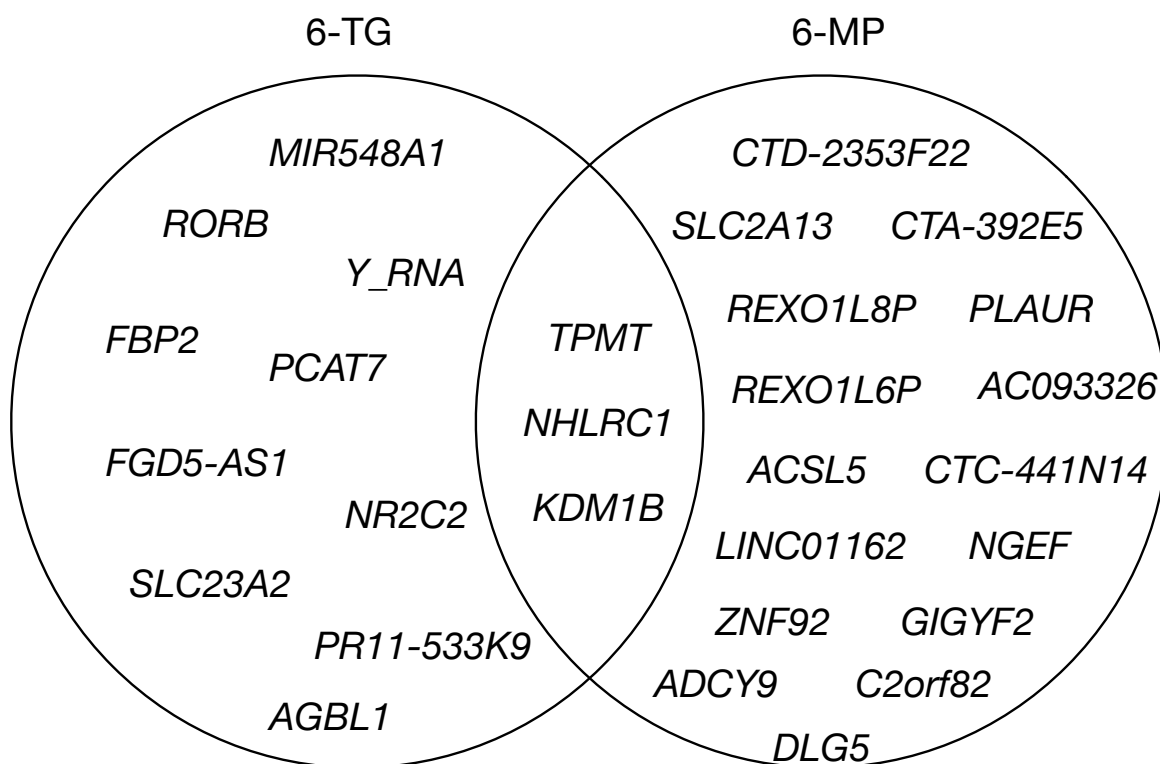
	Uuring 1 (substraat 6-TG)	Uuring 2 (substraat 6-MP)
Geenisesed markerid (markeritega seotud geene)	92	112
	(13)	(19)
Intergeensed markerid	37	16
Kokku	129	128

Assotsieerunud markeritega seotud geenid on välja toodud graafiliselt Manhattan joonistel (joonis 3A ja 3B), Venni diagrammil (joonis 4) ja tabelis 5. Kõik uuringutes assotsieerunud markerid on väljatoodud tabelitena lisas (lisa 1 ja 2). Joonised 3A ja 3B kujutavad graafiliselt GWAS-i tulemusi, millest esimeses kasutati TPMT substraadina 6-TG-d ja teises 6-MP-d.



Joonis 3. GWAS-i tulemused TPMT substraadiga A) 6-tioguaaniin ja B) 6-merkaptopuriin Manhattan joonisel. X-teljel on assotsieerunud markerite positsioon genoomis, y-teljel negatiivne kümnendlogaritm p-väärtusest. Joonistele on märgitud geenid, milles asuvad assotsieerunud markerid.

Paremal ülemises nurgas on kujutatud kvantiilide joonis (x-teljel oodatud ja y-teljel vaadeldud negatiivne kümnendlogaritm p-väärtusest), mis kajastab uuringu tulemuste kõrvalekallet nullhüpoteesist.



Joonis 4. Uuringute tulemused Venni diagrammil. Joonisel on kuvatud assotsieerunud geenide nimed. Tulemused kattuvad kolme geeni korral, ülejäänud assotsiatsioonid on esindatud ühes (6-TG) või teises (6-MP) uuringus. 6-TG – 6-tioguaaniin; 6-MP – 6-merkaptopuriin.

Tabel 5. TPMT aktiivsuse assotsiatsiooniuuringu põhitulemused. Iga geeni kohta on välja toodud kõige tugevamalt assotsieerunud marker.

GEEN	Marker	Kr.	Positsioon	Efekti/teine alleel	EAF	Beta (1)	p-väärtus (1)	Beta (2)	p-väärtus (2)
<i>TPMT</i>	rs77095250	6	18157866	C/T	0,027	-	-	-1,5542	1,16x10 ⁻²²
<i>TPMT</i>	rs12201199	6	18139802	T/A	0,041	-1,5894	5,33x10 ⁻³⁸	-1,0517	5,36x10 ⁻¹⁸
<i>NHLRC1</i>	rs150694038	6	18123462	A/AC	0,072	-0,9749	3,40x10 ⁻²⁴	-0,6272	7,31x10 ⁻¹¹
<i>KDM1B</i>	rs79325856	6	18161232	G/A	0,027	-	-	-1,5547	1,18x10 ⁻²²
<i>NHLRC1</i>	rs12111366	6	18122942	C/G	0,026	-	-	-1,5409	2,81x10 ⁻²²
<i>KDM1B</i>	rs9367982	6	18183232	T/A	0,813	0,4355	4,97x10 ⁻¹³	-	-
<i>CTD-2353F22</i>	rs13171357	5	36695056	A/G	0,034	-	-	0,2851	4,47x10 ⁻⁸
<i>SLC2A13</i>	12:40055136	12	40055136	G/A	0,027	-	-	0,7977	2,98x10 ⁻⁷
<i>CTA-392E5</i>	rs149428055	8	86951194	A/G	0,082	-	-	0,4544	4,65x10 ⁻⁷
<i>REXO1L8P</i>	rs4081970	8	86554933	G/A	0,082	-	-	0,4584	7,37x10 ⁻⁷
<i>REXO1L6P</i>	rs117134244	8	86841484	A/T	0,084	-	-	0,4303	1,14x10 ⁻⁶

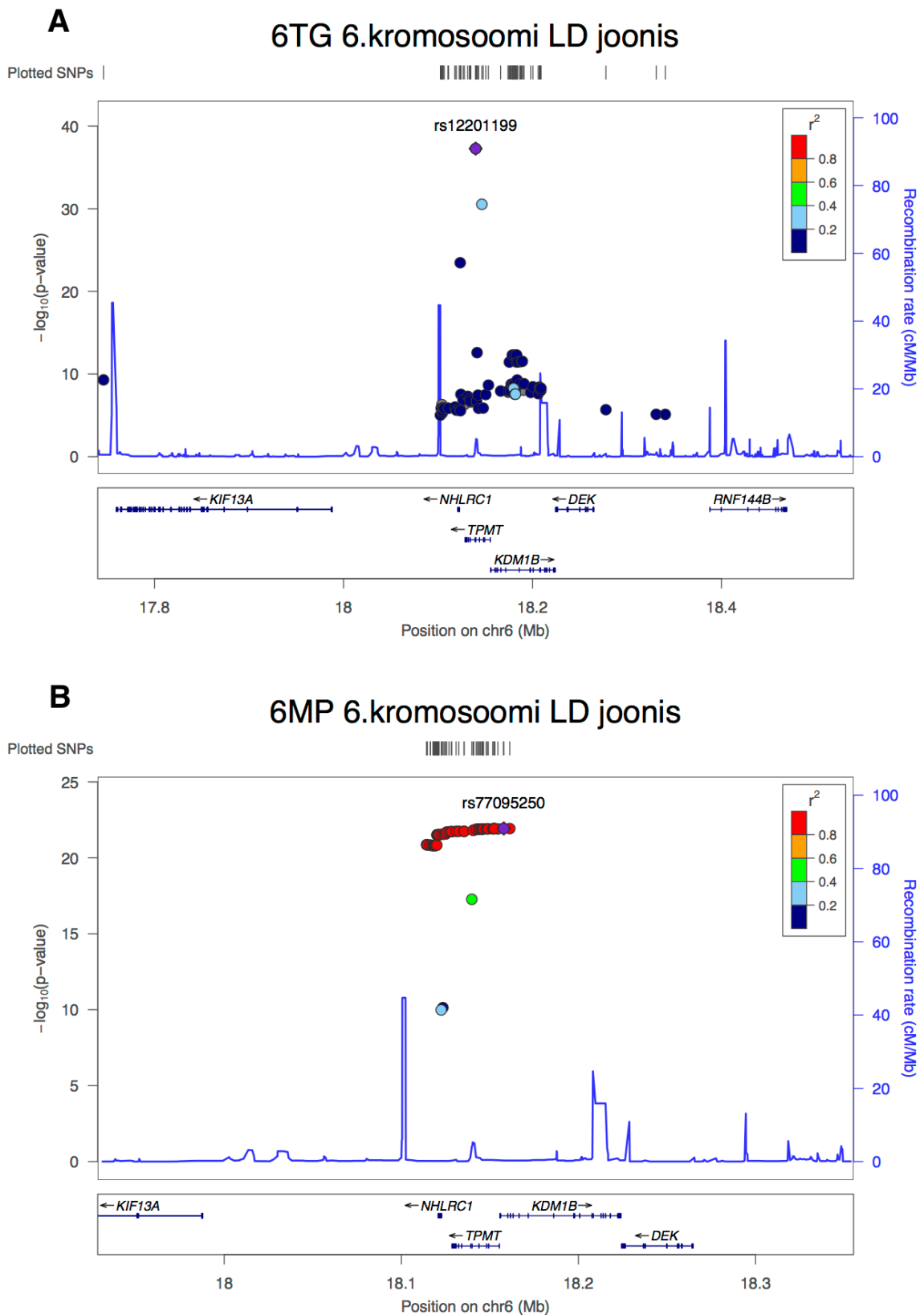
GEEN	Marker	Kr.	Positsioon	Efekti/teine alleel	EAF	Beta (1)	p-väärtus (1)	Beta (2)	p-väärtus (2)
<i>MIR548A1</i>	rs202125962	6	18575682	AT/A	0,023	-0,7889	1,23x10 ⁻⁶	-	-
<i>PLAUR</i>	rs11672362	19	44149900	T/C	0,016	-	-	0,9342	1,30x10 ⁻⁶
<i>RORB</i>	rs56744128	9	77248731	G/A	0,241	-0,2694	1,77x10 ⁻⁶	(-0,2324)	(4,79x10 ⁻⁵)
<i>AC093326</i>	rs62104184	2	542879	A/G	0,120	-	-	0,3726	1,98x10 ⁻⁶
<i>Y_RNA</i>	6:18277666	6	18277666	GAAGAA GGTTCTT CCATAC/ G	0,012	-1,0315	2,04x10 ⁻⁶	-	-
<i>ACSL5</i>	rs143280402	10	114131536	G/A	0,018	-	-	0,9030	2,27x10 ⁻⁶
<i>CTC-44IN14</i>	rs9112	5	121518309	A/G	0,367	-	-	0,2324	2,56x10 ⁻⁶
<i>LINC01162</i>	rs2270235	7	21051467	A/G	0,080	-	-	0,4245	3,29x10 ⁻⁶
<i>GIGYF2</i>	rs369686924	2	233701000	T/A	0,028	-	-	0,6984	3,55x10 ⁻⁶
<i>ADCY9</i>	rs62036957	16	4064637	C/G	0,916	-	-	-0,4095	4,18x10 ⁻⁶
<i>DLG5</i>	rs117081398	10	79667078	C/T	0,019	-	-	0,8043	4,90x10 ⁻⁶
<i>FBP2</i>	rs10993244	9	97317540	G/C	0,116	-0,3447	4,99x10 ⁻⁶	-	-
<i>PCAT7</i>	rs11998973	9	97314815	A/T	0,116	-0,3437	5,41x10 ⁻⁶	-	-
<i>C2orf82</i>	rs72617184	2	233736981	C/G	0,027	-	-	0,6847	5,59x10 ⁻⁶
<i>FGD5-AS1</i>	rs13097015	3	14992135	T/C	0,097	0,3765	5,76x10 ⁻⁶	-	-
<i>NGEF</i>	rs72617185	2	233777204	T/C	0,029	-	-	0,6700	6,17x10 ⁻⁶
<i>NR2C2</i>	rs35741051	3	15028462	A/T	0,098	0,3721	6,79x10 ⁻⁶	-	-
<i>SLC23A2</i>	rs13045713	20	4847211	G/C	0,226	0,2554	7,12x10 ⁻⁶	-	-
<i>ZNF92</i>	rs11379548	7	64853551	TA/T	0,168	-	-	0,3001	8,90x10 ⁻⁶
<i>RP11-533K9</i>	rs12340469	9	97278689	C/T	0,116	-0,3369	9,12x10 ⁻⁶	-	-
<i>AGBL1</i>	rs72752169	15	86746994	T/C	0,166	-0,2808	9,79x10 ⁻⁶	-	-

Beta (1) ja p-väärtus (1) on uuringu 1 (TPMT substraadiks 6-TG) tulemused, Beta (2) ja p-väärtus (2) on uuringu 2 (TPMT substraadiks 6-MP) tulemused. Kr. – kromosoom; EAF – efekti/alleeli sagedus.

Parima p-väärtusega tulemused on mõlemas uuringus 6. kromosoomis, kus asub TPMT geen. Selle põhjal saab järeldada, et suurim mõju TPMT aktiivsusele on seotud mutatsioonidega TPMT geenis. Samuti kattuvad uuringute tulemused kahe järgmise statistiliselt olulise seose poolest, milleks on assotsiatsioonid geenidega *KDM1B* ja *NHLRC1*, mis asuvad TPMT lähedal 6. kromosoomis. Uuringute tulemusi võrreldes rohkem statistiliselt olulisi kattuvaid markereid ei tuvastatud.

Tulemuste aheldustasakaalutuse (LD) visualiseerimiseks 6. kromosoomis koostati LocusZoom'iga (Pruim jt., 2010) regionaaljoonised, millel on 6-TG uuringust esitatud ühe regiooni 66 markerit (*TPMT*, *NHLRC1* ja *KDM1B* geenidest), lisaks ülejäänud identifitseeritud markerid 6. kromosoomist (joonis 5A). 6-MP uuringu 6. kromosoomist identifitseeritud 63 markeri põhjal koostati teine regionaaljoonis (joonis 5B).

Joonistel 5A ja 5B on näha, et enamik SNP-id on koondunud ühte regiooni, mis väljendab markerite väga tugevat korrelatsiooni ning kõrget aheldatust. Vaid üksikud SNP-id on eraldiseisvad ning teiste markeritega võrreldes üksteisega vähem aheldunud.



Joonis 5. A) 6-tioguaaniini (TG) ja **B)** 6-merkaptopuriiniga (MP) teostatud uuringute 6. kromosoomist leitud markerite regionaaljoonis. Erineva värvusega on kujutatud markerite LD (r^2) **A)** markeriga rs12201199 ja **B)** markeriga rs77095250. X-teljel on markerite positsioonid ja geenide asukohad genoomis. Vasakpoolisel y-teljel on negatiivne kümnendlogaritm p-väärtusest ja parempoolisel y-teljel rekombinatsiooni sagedus. LD – linkage disequilibrium (aheldustasakaalutus)

2.4 Arutelu

Tiopuriinravimite efektiivsust seostatakse eelkõige TPMT aktiivsusega, mida mõjutavad kõige enam variatsioonid *TPMT* geenis, mis omakorda põhjustavad valgu katalüütilise aktiivsuse või degradatsiooni kiiruse muutuse. Käesoleva töö raames uuriti TPMT aktiivsust mõjutavaid geneetilisi markereid üle genoomi, kasutades tunnusena kahe erineva substraadiga (6-TG ja 6-MP) mõõdetud ensüümi aktiivsust. Kuna GWAS teostati samade indiviidide andmeid ja proove kasutades, saab kahte uuringut omavahel hästi võrrelda.

Tavaliselt kasutatakse GWAS-ide puhul statistilise olulisuse määrana $p < 5 \times 10^{-8}$ (Jannot jt., 2015), kuid antud uuringus seati piir kõrgemale ($p < 1 \times 10^{-6}$), et kaasata markereid, mis jäävad “halli alasse”.

Kasutades ensüümi aktiivsuse määramiseks substraadina 6-MP-d (edaspidi 6-MP uuring), identifitseeriti *TPMT* geenis 37 markerit, millest tugevaima assotsiatsiooni andis geeni 5'-UTR regioonis asuv SNP rs77095250. Määrates TPMT aktiivsust substraadiga 6-TG (edaspidi 6-TG uuring) identifitseeriti GWAS analüüsis 19 assotsieerunud markerit, millest kõige suurema statistilise olulisusega oli *TPMT* geeni introni marker rs12201199. Ühtlasi oli see suurima statistilise olulisusega marker antud uuringus ($p = 5,33 \times 10^{-38}$).

6-MP uuringus tuvastati üks assotsieerunud marker rs79325856 ja 6-TG uuringus 41 markerit *KDM1B* geenis. Kõige tugevama seose nendest andis deletsioon 5'-UTR regioonis (rs150694038). *KDM1B* geen kodeerib lüsiini-spetsiifilist demetülaasi, mis katalüüsib mono- ja dimetüleeritud H3K4 histoonide demetülatiooni ning osaleb transkriptsiooni regulatsioonis ja genoomi verimises (Zhang jt., 2013).

6-MP uuringus identifitseeriti 25 *NHLRC1* geeniga assotsieerunud markerit, milledest kõige suurema statistilise olulisusega on geeni 5'-UTR regioonis asuv marker rs12111366. 6-TG uuringus leiti 6 markerit, nendest suurima statistilise olulisusega on deletsioon geeni 5'-UTR regioonis (rs150694038). *NHLRC1* kodeerib E3 ligaasi, mis ubiquitineerib ja aitab kaasa *laforin*-i (süsivesikuid siduva domääniga fosfataasi) ja teiste glükogeeni metabolismis osalevate valkude lagundamisele. Mutatsioone *NHLRC1* geenis seostatakse põhiliselt müokloonse epilepsiaga. (Gentry jt., 2005)

Oluline on märkida, et SNP-id *TPMT*, *KDM1B* ja *NHLRC1* geenide piirkonnas on omavahel tugevalt aheldunud ja kõige tugevam seos TPMT aktiivsusega on mõlema substraadi korral siiski *TPMT* geenis. See ei välista teiste geenide võimalikku seost TPMT aktiivsusega, kuid pigem on selle põhjuseks siiski aheldatus *TPMT* SNP-idega. Antud seoste visualiseerimisel (joonis 5A ja 5B) on selgelt näha, et kõik kolm geeni asuvad rekombinatsiooniderohke ala vahel. 6-MP puhul on kõik markerid omavahel väga tugevas korrelatsioonis ($r^2 > 0,8$, v.a paar

SNP-i), kuid 6-TG puhul on kõige tugevam seos (rs12201199) nõrgas korrelatsioonis ülejäänud markeritega antud piirkonnas ning on vaja põhjalikku statistilist analüüsi, et selgitada seoste üksteisest sõltumatust.

Kahes läbiviidud GWAS-i tulemustest tuvastati mitmeid assotsiatsioone mittekodeerivaid RNA-sid (ncRNA) kodeerivate geenidega. 6-TG uuringus identifitseeriti eelnimetatud assotsiatsioone geenidega *MIR548A1*, *Y_RNA*, *PCAT7* ja *FGD5-AS1*. 6-MP uuringus identifitseeriti vastavaid assotsiatsioone geenidega *CTD-2353F22*, *CTC-441N14*, *CTA-392E5*, *AC093326* ja *LINC01162*. ncRNA molekulid on seostatud juba mitmete erinevate haigustega (Esteller, 2011). On tuvastatud, et ANRIL *antisense* ncRNA ekspressiooniga korreleeruvad kõrgendatud riskifaktorid koronaarse südamehaiguse ja parodontiidiga (Bochenek jt., 2013). Käesoleva uuringu leidude seoseid TPMT aktiivsusega pole varasemalt kirjeldatud, kuid väärksid kindlasti edasist uurimist funktsionaalsete katsetega.

6-TG uuringus tuvastati assotsiatsioone järgmiste geenidega:

- *RORB* geen kodeerib tuuma retseptorite perekonda kuuluvat orb-retseptorit, mis on transkriptsioonifaktor. Transkriptsiooniline transaktivatsioon on reguleeritud väikeste lipofiilsete molekulide, nagu steroidhormoonide, vitamiin D, retinoidide ja kilpnäärmehormoonide poolt. (Evans, 1988; Carlberg jt., 1994) Tugevaima assotsiatsiooni andis introni marker rs56744128. Assotsiatsioon tuvastati ka 6-MP uuringus, kuid markeri statistiline olulisus ei mahtunud määratud piiridesse ($p = 4,79 \times 10^{-5}$).
- *FBP2* geen kodeerib fruktoos-1,6-bisfosfataasi, mis hüdrolyüsib fruktoos-1,6-bisfosfaadi fruktoos-1-fosfaadiks ja anorgaaniliseks fosfaadiks (Tillmann ja Eschrich, 1998). Ensüüm on lihastes paiknev glükoneogeneesi võtmeensüüm (Dzugaj, 2006).
- *NR2C2* geen kodeerib tuuma retseptorite perekonda kuuluvat orb-retseptorit, mis on transkriptsioonifaktor (Yoshikawa jt., 1996). Funktsioonid on seotud üldise arengu, rakkude diferentseerumise ja homöostaasiga (Mu jt., 2004).
- *SLC23A2* geen kodeerib Na^+ -iooni kontsentratsioonist sõltuvat askorbiinhappe transportervalgu. Askorbiinhappe transport on seotud kahe geeni *SLC23A1* ja *SLC23A2* produktiga. *SLC23A2* on lokaliseeritud neuroendokriinsetes, eksokriinsetes ja endoteeli kudedes. (Rubin jt., 2005)
- *AGBL1* geen kodeerib tsütosoolse karboksüpeptidaasi perekonda kuuluvat valku, mis katalüüsib glutamaadi dekarboksülaasi. Valk interakteerub ka transkriptsioonifaktor 4-ga (TCF 4). (Riazuddin jt., 2013)

- *RP11-533K9* on pseudogeen [10].

6-MP uuringus tuvastati assotsiatsioone järgmiste geenidega:

- *SLC2A13* geen kodeerib H^+ -iooni ja müo-inositooli sümporterit, mis lokaliseerub põhiliselt ajus, nii astrotsüütides kui ka neuronites (Uldry jt., 2001).
- *PLAUR* geen kodeerib membraaniseoselist urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaatori retseptorit [11], mis reguleerib raku pinna plasminogeeni aktivatsiooni (Huai jt., 2006).
- *ACSL5* geen kodeerib atsüül-koensüüm A (atsüül-CoA) süntetaaside perekonda kuuluvat valku (Yamashita jt., 2000), mis katalüüsib atsüül-CoA moodustumist rasvhapetest, ATP-st ja CoA-st (Watkins, 1997). Ensüüm lokaliseerub ajus ning on madala ekspressiooniga. Glioblastoomi korral tõuseb geeni ekspressioonitase märgatavalt. (Yamashita jt., 2000)
- *GIGYF2* geeni produkt on seotud türosiinkinaasi retseptori signaalide reguleerimisega [12]. Geen asub genoomi regioonis, mis on seotud Parkinsoni tõve tüüp 11-ga (Lautier jt., 2008).
- *ADCY9* geen kodeerib adenülaaditsüklaasi, mis on kõrgelt ekspresseeritud käärsooles. Samuti avaldub kopsudes, neerudes, põrnas, testistes ja munasarjas. (Ludwig ja Seuwen, 2002)
- *DLG5* geen kodeerib membraanseoseliste guanülaadi kinaaside perekonda kuuluvat valku [13].
- *ZNF92* geen kodeerib “tsink-sõrme” valku, mis on transkriptsioonifaktor. Selle kõrgeim ekspressioonitase on tuvastatud T-lümfotsüütides (Bellefroid jt., 1993).
- *NGEF* geen kodeerib neuronaalse guaniini nukleotiidivahetusfaktorit, mis on ekspresseeritud kesknärvisüsteemi neuronites (Zhang jt., 2007).
- *REXO1L6P* ja *REXO1L8P* on RNA eksonukleas 1 pseudogeenid [14,15].
- *C2orf82* kodeerib tundmatu funktsiooniga valku [16].

Hetkel ei ole teada, kuidas eelnevalt kirjeldatud geenid võiksid mõjutada TPMT aktiivsust. Ensüümi aktiivsus erütrotsüütides on tugevas korrelatsioonis aktiivsusega maksas (Szumlanski jt., 1992), kuid eelkirjeldatud geenid teadaolevalt ei avaldu ei erütrotsüütides ega maksas. Samuti ei leidu seoseid ravimite metabolismi erinevate radadega.

Kui tavaliselt kasutatakse GWAS-ide puhul statistilise olulisuse määrana $p < 5 \times 10^{-8}$ (Jannot jt., 2015), siis antud uuringus seati piir kõrgemale ($p < 1 \times 10^{-6}$), et kaasata markereid, mis jäävad “halli alasse”. Kuna enamik markereid jäävad lävest $p < 5 \times 10^{-8}$ allapoole, on

võimalik, et tegemist on juhuslike leidudega ning bioloogilised seosed tuvastatud geenides puuduvad. Tulemuste kinnitamiseks tuleb antud seoseid kontrollida sõltumatus kohordis.

Mitmed uuringutes assotsieerunud markerid jäid genoomi intergeensesse regiooni. Täpsemalt, 37 markerit 6-TG uuringus ja 16 markerit 6-MP uuringus. Geenidevahelises alas paiknevate markerite tähtsus pole selge, kuid seal võivad paikneda olulised geeniekspressiooni mõjutajad (Macintyre jt., 2014). Geenidevahelises alas paikneva DNA funktsiooni paremaks mõistmiseks on algatatud NIH Roadmap Epigenomics Mapping Program ^[17], mille eesmärgiks on inimese epigenoomi kaardistamine. See käsitleb DNA ja histoonide keemilisi modifikatsioone, mis mõjutavad kromatiini struktuuri ja DNA kättesaadavust ensüümidele (Bernstein jt., 2007). Antud uuringute raames tuvastatud markerid intergeenses regioonis võivad mõjutada kromatiini struktuuri ja DNA kättesaadavust ensüümidele, mis omakorda võivad mõjutada TPMT aktiivsust.

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda kahte uuringut ning võib öelda, et statistiliselt olulised tulemused kahe uuringu vahel ei erine. Samas “hallis alas” esinevate seoste detailne uurimine näitab, et tulemused erinevad üksteisest väga suurel määral. Kahe uuringu peale kokku tuvastati 29 TPMT aktiivsusega assotsieerunud geeni, millest vaid kolm on esindatud mõlema uuringu tulemustes. Ilmselt on suur uuringute omavaheline erinevus tingitud pigem juhuslikest seostest. Samas erinevuste tõttu 6-MP ja 6-TG metabolismiradades võib siiski leiduda ka erinevaid geene, mis mõlema substraadi korral määravad TPMT aktiivsuse.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö raames võrreldi kahe ülegenoomse assotsiatsiooniuuringuga identifitseeritud tiopuriinmetüültransferaasi (TPMT) ensüümi aktiivsust mõjutavaid geneetilisi markereid.

6-tioguaaniini uuringus identifitseeriti 129 kvaliteedikontrolli läbinud markerit. Kokku tuvastati 13 geenis 92 markerit, ülejäänud 37 markerit olid intergeenses regioonis.

6-merkaptopuriini uuringus identifitseeriti 128 kvaliteedikontrolli läbinud markerit, millest 112 geenisisest assotsiatsiooni hõlmasid 19 erinevat geeni ning 16 assotsiatsiooni olid intergeenses regioonis. Statistilise olulisuse määrana kasutati uuringutes $p < 1 \times 10^{-6}$.

Hetketeadmiste põhjal ei osata uuringutes assotsieerunud geenide funktsioone TPMT ja ravimite metabolismiga seostada. Siiski on oluline märkida, et kahe uuringu peale kokku tuvastatud 29-st geenist üheksa kodeerivad mittekodeerivaid RNA-sid, mille mõju TPMT aktiivsuse mõjutamises on praegu ebaselge, kuid väärrib kindlasti edasist uurimist funktsionaalsete katsetega.

Uuringute tulemused kattusid kolme kõige tugevamini assotsieerunud geeni *TPMT*, *NHLRC1* ja *KDM1B* osas. Kõige tugevama seose andsid mõlemas uuringus SNP-id *TPMT* geenis. Kuna *NHLRC1* ja *KDM1B* asuvad *TPMT*-ga samas genoomipiirkonnas ning SNP-id on suures osas üksteisega aheldunud, on nende seos TPMT aktiivsusega küll võimalik, aga vähetõenäoline ning vajab edasist uurimist.

Rohkem kattuvaid assotsiatsioone uuringute vahel ei tuvastatud, millest järeldub, et lisaks muutustele *TPMT* geenis on TPMT aktiivsus mõjutatud erinevate faktorite poolest, mis sõltuvad kasutatavast tiopuriinravimist ehk substraadist.

Genome-Wide Association Study for genetic markers of thiopurine methyltransferase

Mattis Jaama

SUMMARY

Thiopurine drugs, like 6-mercaptopurine and 6-thioguanine are cytotoxic drugs, used in the treatment of leukemia, Crohn's disease etc. Thiopurine methyltransferase (TPMT) is the main enzyme metabolizing thiopurine drugs through methylation. It is important to detect TPMT activity level before starting therapy with thiopurine drugs, because TPMT activity varies highly between individuals. Incorrect dosage may result in severe side-effects or insufficient clinical response.

TPMT activity is primarily affected by mutations in the *TPMT* gene, but the genotype and expected phenotype do not always coincide. That gives reason to assume that TPMT activity is influenced by other previously not described genetic factors in addition to mutations in the *TPMT* gene. Genome-Wide Association Studies (GWAS) are commonly used to detect novel genetic markers, and was also used in this study to identify new genes related to TPMT activity.

This study is based on two GWA studies, conducted to detect genetic markers associated with TPMT activity using two different substrates (6-mercaptopurine and 6-thioguanine). Both studies in this research used data from same individuals, who were randomly collected among all gene donors in Estonian Genome Center, University of Tartu. Samples from 844 individuals were chosen for further analysis.

129 genetic markers were identified using 6-thioguanine as TPMT substrate. 92 markers were located in or near 13 genes, while 37 markers were in intergenic regions.

128 genetic markers were identified using 6-mercaptopurine as TPMT substrate. Of these 112 markers were located in or near 19 genes and 16 markers were in intergenic regions. Statistical significance level $p < 1 \times 10^{-6}$ was used.

Genes identified in the GWAS could not be linked with TPMT catalysed methylation or thiopurine drugs metabolism based on the currently available literature. Even so it is worth mentioning that nine out of 29 identified genes encode non-coding RNA (ncRNA), which can

affect TPMT activity post-transcriptionally. The importance of ncRNA in the regulation of TPMT RNA levels is not clear but it deserves further analysis.

Associations with *TPMT*, *NHLRC1* and *KDM1B* were the only three genes identified in both studies. The most significant association in both studies was a marker in the *TPMT* gene. Linkage disequilibrium analysis was followed, because *TPMT*, *NHLRC1* and *KDM1B* are located in the same region in the genome, and high correlation between most markers was found. That means that the association of *NHLRC1* and *KDM1B* with TPMT activity is possible but unlikely and requires further study.

No more matching associations between two studies were found, therefore in addition to mutations in the *TPMT* gene, enzyme activity is affected by different genetic factors, depending on which thiopurine drug is used.

TÄNUAVALDUSED

Soovin oma suurimad tänusõnad pühendada juhendajatele Lili Milanile ja Riin Tammele. Lisaks soovin abi ja näpunäidete eest tänada Evelin Mihalovit ja Toomas Hallerit.

Samuti tänan lähedasi toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aarbakke, J., 1995. Biology and pharmacology of thiopurines. *Pediatric hematology and oncology*, 12(5), pp.511–9.
- Abecasis, G.R. jt., 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422), pp.56–65.
- De Abreu, R. jt., 1995. Thiopurine induced disturbance of DNA methylation in human malignant cells. *Advances in enzyme regulation*, 35, pp.251–63.
- Allan, P.W. ja Bennett, L.L., 1971. 6-Methylthioguanilic acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochemical pharmacology*, 20(4), pp.847–52.
- Alves, S., 2001. Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 70(2), pp.165–174.
- American Medical Association, 2011. Pharmacogenomics: Increasing the Safety and Effectiveness of Drug Therapy. Available at: <http://www.ama-assn.org/resources/doc/genetics/pgx-brochure-2011.pdf> [Accessed May 17, 2015].
- Anglicheau, D. jt., 2002. Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic–phenotypic correlation. *Journal of Chromatography B*, 773(2), pp.119–127.
- Barrett, J.C. ja Cardon, L.R., 2006. Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nature genetics*, 38(6), pp.659–62.
- Bellefroid, E.J. jt., 1993. Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. *The EMBO journal*, 12(4), pp.1363–74.
- Bernstein, B.E., Meissner, A. ja Lander, E.S., 2007. The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), pp.669–81.
- Bochenek, G. jt., 2013. The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Human molecular genetics*, 22(22), pp.4516–27.
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), pp.177–186.
- Bush, W.S. ja Moore, J.H., 2012. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*, 8(12), p.e1002822.
- Carlberg, C. jt., 1994. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 8(6), pp.757–70.
- Daly, A.K., 2010. Genome-wide association studies in pharmacogenomics. *Nature reviews. Genetics*, 11(4), pp.241–6.

- Dervieux, T. jt., 2001. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer research*, 61(15), pp.5810–6.
- Dzugaj, A., 2006. Localization and regulation of muscle fructose-1,6-bisphosphatase, the key enzyme of glyconeogenesis. *Advances in enzyme regulation*, 46(1), pp.51–71.
- Ehret, G.B., 2010. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Current hypertension reports*, 12(1), pp.17–25.
- Eichler, E.E. jt., 2007. Completing the map of human genetic variation. *Nature*, 447(7141), pp.161–5.
- Elion, G.B., 1989. The purine path to chemotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4900), pp.41–7.
- Esteller, M., 2011. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics*, 12(12), pp.861–74.
- Evans, D.A., Manley, K.A. ja McKusick, V.A., 1960. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *British medical journal*, 2(5197), pp.485–91.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4854), pp.889–95.
- Evans, W.E. ja Relling, M. V, 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5439), pp.487–91.
- Fessing, M.Y., Krynetski, E.Y., jt., 1998. Functional characterization of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene promoter. *European journal of biochemistry / FEBS*, 256(3), pp.510–7.
- Fessing, M.Y., Belkov, V.M., jt., 1998. Molecular cloning and functional characterization of the cDNA encoding the murine thiopurine S-methyltransferase (TPMT). *FEBS letters*, 424(3), pp.143–5.
- Fotoohi, A.K., Coulthard, S.A. ja Albertioni, F., 2010. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochemical pharmacology*, 79(9), pp.1211–20.
- Frazer, K.A. jt., 2009. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature reviews. Genetics*, 10(4), pp.241–51.
- Gardiner, S.J. ja Begg, E.J., 2006. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacological reviews*, 58(3), pp.521–90.
- Gentry, M.S., Worby, C.A. ja Dixon, J.E., 2005. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), pp.8501–6.

- Hardy, J. ja Singleton, A., 2009. Genomewide association studies and human disease. *The New England journal of medicine*, 360(17), pp.1759–68.
- Hon, Y.Y. jt., 1999. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Human molecular genetics*, 8(2), pp.371–6.
- Howie, B.N., Donnelly, P. ja Marchini, J., 2009. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics*, 5(6), p.e1000529.
- Huai, Q. jt., 2006. Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), pp.656–9.
- International HapMap Consortium, 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), pp.1299–320.
- Jancova, P., Anzenbacher, P. ja Anzenbacherova, E., 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 154(2), pp.103–16.
- Jannot, A.-S., Ehret, G. ja Perneger, T., 2015. $P < 5 \times 10^{-8}$ has emerged as a standard of statistical significance for genome-wide association studies. *Journal of clinical epidemiology*, 68(4), pp.460–5.
- Johnson, J.A., 2003. Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends in genetics : TIG*, 19(11), pp.660–6.
- Kalow, W., Tang, B.K. ja Endrenyi, L., 1998. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics*, 8(4), pp.283–9.
- Karas-Kuzelicki, N. ja Mlinaric-Rascan, I., 2009. Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics*, 10(8), pp.1309–1322.
- Kim, H.-Y. jt., 2015. Complete sequence-based screening of TPMT variants in the Korean population. *Pharmacogenetics and genomics*, 25(3), pp.143–6.
- Kirchheiner, J. ja Seeringer, A., 2007. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1770(3), pp.489–94.
- Kitchen, B.J. jt., 1999. Thioguanine administered as a continuous intravenous infusion to pediatric patients is metabolized to the novel metabolite 8-hydroxy-thioguanine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 291(2), pp.870–4.
- Kröplin, T. jt., 1998. Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *European journal of clinical ...*, 54(3), pp.265–271.
- Kröplin, T. ja Iven, H., 2000. Methylation of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine by thiopurine S-methyltransferase. A comparison of activity in red blood cell samples of 199 blood donors. *European journal of clinical pharmacology*, 56(4), pp.343–5.

- Krynetski, E.Y. jt., 1995. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), pp.949–53.
- Krynetski, E.Y. jt., 1996. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics*, 6(4), pp.279–90.
- Krynetski, E.Y. jt., 1997. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC1 genomic library. *Pharmaceutical research*, 14(12), pp.1672–8.
- Krynetski, E.Y. ja Evans, W.E., 1999. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharmaceutical research*, 16(3), pp.342–9.
- Kumar, V. jt., 2013. Human disease-associated genetic variation impacts large intergenic non-coding RNA expression. *PLoS genetics*, 9(1), p.e1003201.
- Lautier, C. jt., 2008. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *American journal of human genetics*, 82(4), pp.822–33.
- Lee, D. jt., 1995. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 23(3), pp.398–405.
- Lennard, L., 1992. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European journal of clinical pharmacology*, 43(4), pp.329–39.
- Lennard, L. jt., 1987. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 41(1), pp.18–25.
- Lennard, L. ja Singleton, H.J., 1994. High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 661(1), pp.25–33.
- Lewis, L.D. jt., 1997. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 62(4), pp.464–75.
- Loit, E. jt., 2011. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clinical biochemistry*, 44(10-11), pp.751–7.
- Ludwig, M.-G. ja Seuwen, K., 2002. Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms. *Journal of receptor and signal transduction research*, 22(1-4), pp.79–110.
- Ma, Q. ja Lu, A.Y.H., 2011. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacological reviews*, 63(2), pp.437–59.

- Macintyre, G. jt., 2014. Associating disease-related genetic variants in intergenic regions to the genes they impact. *PeerJ*, 2, p.e639.
- Manolio, T.A., 2009. Cohort studies and the genetics of complex disease. *Nature genetics*, 41(1), pp.5–6.
- Manolio, T.A. jt., 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461(7265), pp.747–53.
- Manolio, T.A., 2010. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England journal of medicine*, 363(2), pp.166–76.
- Marchini, J. jt., 2007. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nature genetics*, 39(7), pp.906–13.
- Marchini, J. ja Howie, B., 2010. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nature reviews. Genetics*, 11(7), pp.499–511.
- McGuire, A.L., 2008. 1000 Genomes on the Road to Personalized Medicine. *Personalized medicine*, 5(3), pp.195–197.
- McLeod, H.L. ja Siva, C., 2002. The thiopurine S-methyltransferase gene locus -- implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, 3(1), pp.89–98.
- Mu, X. jt., 2004. Targeted inactivation of testicular nuclear orphan receptor 4 delays and disrupts late meiotic prophase and subsequent meiotic divisions of spermatogenesis. *Molecular and cellular biology*, 24(13), pp.5887–99.
- Odland, B. jt., 1986. Serum azathioprine and 6-mercaptopurine levels and immunosuppressive activity after azathioprine in uremic patients. *International Journal of Immunopharmacology*, 8(1), pp.1–11.
- Ottensmeyer, D. jt., 1997. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 62(1), pp.60–73.
- Pe'er, I. jt., 2006. Evaluating and improving power in whole-genome association studies using fixed marker sets. *Nature genetics*, 38(6), pp.663–7.
- Pearson, T.A. ja Manolio, T.A., 2008. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 299(11), pp.1335–44.
- Pennisi, E., 2011. The Biology of Genomes. Disease risk links to gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6033), p.1031.
- Pettersson, F.H. jt., 2009. Marker selection for genetic case-control association studies. *Nature protocols*, 4(5), pp.743–52.
- Price, A.L. jt., 2010. New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nature reviews. Genetics*, 11(7), pp.459–63.
- Pruim, R.J. jt., 2010. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(18), pp.2336–7.

- Purcell, S. jt., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, 81(3), pp.559–75.
- Ratner, M., 2005. FDA pharmacogenomics guidance sends clear message to industry. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(5), p.359.
- Relling, M. V jt., 1999. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 93(9), pp.2817–23.
- Riazuddin, S.A. jt., 2013. Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4. *American journal of human genetics*, 93(4), pp.758–64.
- Richard, V.S., Al-Ismail, D. ja Salamat, A., 2007. Should we test TPMT enzyme levels before starting azathioprine? *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 12(4), pp.359–60.
- Roberts, R.L. jt., 2008. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(5), pp.434–8.
- Ross, S. jt., 2012. Promises and challenges of pharmacogenetics: an overview of study design, methodological and statistical issues. *JRSM cardiovascular disease*, 1(1), p.2.
- Rubin, S.A., Dey, S. ja Reidling, J.C., 2005. Functional analysis of two regulatory regions of the human Na⁺-dependent vitamin C transporter 2, SLC23A2, in human vascular smooth muscle cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1732(1-3), pp.76–81.
- Rushmore, T.H. ja Kong, A.-N.T., 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current drug metabolism*, 3(5), pp.481–90.
- Salavaggione, O.E. jt., 2005. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenetics and genomics*, 15(11), pp.801–15.
- Schork, N.J., 2015. Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature*, 520(7549), pp.609–11.
- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M. ja Cheng, X., 2003. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in biochemical sciences*, 28(6), pp.329–35.
- Schwab, M. jt., 2002. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*, 12(6), pp.429–36.
- Schwab, M. jt., 2001. Shortcoming in the diagnosis of TPMT deficiency in a patient with Crohn's disease using phenotyping only. *Gastroenterology*, 121(2), pp.498–9.
- Schwartz, R., Stack, J. ja Dameshek, W., 1958. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 99(1), pp.164–7.

- Spencer, C.C.A. jt., 2009. Designing genome-wide association studies: sample size, power, imputation, and the choice of genotyping chip. *PLoS genetics*, 5(5), p.e1000477.
- Spire-Vayron de la Moureyre, C. jt., 1999. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics*, 9(2), pp.189–98.
- Spire-Vayron de la Moureyre, C. jt., 1998. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *British journal of pharmacology*, 125(4), pp.879–87.
- Szumslanski, C. jt., 1996. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA and cell biology*, 15(1), pp.17–30.
- Szumslanski, C.L. jt., 1992. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics*, 2(4), pp.148–59.
- Stanulla, M. jt., 2005. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*, 293(12), pp.1485–9.
- Swann, P.F. jt., 1996. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5278), pp.1109–11.
- Zhang, Q. jt., 2013. Structure-function analysis reveals a novel mechanism for regulation of histone demethylase LSD2/AOF1/KDM1b. *Cell research*, 23(2), pp.225–41.
- Zhang, Y. jt., 2007. Regulation of ephexin1, a guanine nucleotide exchange factor of Rho family GTPases, by fibroblast growth factor receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 282(42), pp.31103–12.
- Zondervan, K.T. ja Cardon, L.R., 2007. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nature protocols*, 2(10), pp.2492–501.
- Tai, H.L. jt., 1997. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6444–9.
- Tai, H.L. jt., 1996. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *American journal of human genetics*, 58(4), pp.694–702.
- Tay, B.S. jt., 1969. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochemical pharmacology*, 18(4), pp.936–8.
- Tidd, D.M. ja Paterson, A.R., 1974. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer research*, 34(4), pp.738–46.

- Tillmann, H. ja Eschrich, K., 1998. Isolation and characterization of an allelic cDNA for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase. *Gene*, 212(2), pp.295–304.
- Tong, P. jt., 2010. Sequencing and analysis of an Irish human genome. *Genome biology*, 11(9), p.R91.
- Turner, S. jt., 2011. Quality control procedures for genome-wide association studies. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [jt.]*, Chapter 1, p.Unit1.19.
- Uldry, M. jt., 2001. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *The EMBO journal*, 20(16), pp.4467–77.
- Watkins, P.A., 1997. Fatty acid activation. *Progress in Lipid Research*, 36(1), pp.55–83.
- Weinshilboum, R.M., 2006. Pharmacogenomics: catechol O-methyltransferase to thiopurine S-methyltransferase. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(4-6), pp.539–61.
- Weinshilboum, R.M. ja Sladek, S.L., 1980. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American journal of human genetics*, 32(5), pp.651–62.
- Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), pp.661–78.
- Welter, D. jt., 2014. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp.D1001–6.
- Venter, J.C. jt., 2001. The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), pp.1304–51.
- Vesell, E.S., 1989. Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. *Pharmacology & Therapeutics*, 41(3), pp.535–52.
- Westra, H.-J. jt., 2015. Cell Specific eQTL Analysis without Sorting Cells. *PLoS genetics*, 11(5), p.e1005223.
- Westra, H.-J. jt., 2013. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nature genetics*, 45(10), pp.1238–43.
- Winkler, T.W. jt., 2014. Quality control and conduct of genome-wide association meta-analyses. *Nature protocols*, 9(5), pp.1192–212.
- Visser, P.M., 2008. Sizing up human height variation. *Nature genetics*, 40(5), pp.489–90.
- Wu, H. jt., 2007. Structural basis of allele variation of human thiopurine-S-methyltransferase. *Proteins*, 67(1), pp.198–208.
- Yamashita, Y. jt., 2000. Fatty acid induced glioma cell growth is mediated by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas. *Oncogene*, 19(51), pp.5919–25.

- Yan, L. jt., 2000. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 68(2), pp.210–9.
- Yates, C.R. jt., 1997. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of internal medicine*, 126(8), pp.608–14.
- Yoshikawa, T. jt., 1996. New variants of the human and rat nuclear hormone receptor, TR4: expression and chromosomal localization of the human gene. *Genomics*, 35(2), pp.361–6.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <http://www.imh.liu.se/tpmtalleles/tabell-over-tpmt-alleler?l=en>
2. <http://www.genome.gov/10001688>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi?view+summary=view+summary&build_id=141
5. <http://www.illumina.com>
6. <http://www.affymetrix.com>
7. <http://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute.html>
8. https://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute_v2.html
9. www.1000genomes.org
10. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000224245;r=9:94496275-94512879;t=ENST00000448030
11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_032898.1
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26058>
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9231>
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/441362>
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/392242>
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/389084>
17. <http://ihec-epigenomes.org/research/projects/nih-roadmap/>
- <http://locuszoom.sph.umich.edu/locuszoom/>

LISAD

Lisa 1. Uuringu 1 (TPMT substraadiks 6-TG) tulemused.

Marker	Kr.	Positsioon	Efektialleel	Teine alleel	EAF	BETA	SE	p-väärtus	Imput. info	Geen	Regioon
rs12201199	6	18139802	T	A	0,041	-1,5894	0,1233	5,33E-38	0,9181	<i>TPMT</i>	intron
rs78854369	6	18146415	T	A	0,011	-2,3169	0,1719	2,90E-31	0,9455	<i>TPMT</i>	intron
rs150694038	6	18123462	A	AC	0,072	-0,9749	0,0961	3,40E-24	0,9085	<i>NHLRC1</i>	5'-UTR
rs2842938	6	18141330	C	T	0,821	0,4746	0,0649	2,57E-13	0,9462	<i>TPMT</i>	intron
rs9367982	6	18183232	T	A	0,813	0,4355	0,0603	4,97E-13	0,9918	<i>KDM1B</i>	intron
rs9396836	6	18180922	A	G	0,813	0,4350	0,0602	5,04E-13	0,9941	<i>KDM1B</i>	intron
rs11970773	6	18178613	A	G	0,813	0,4349	0,0602	5,07E-13	0,9938	<i>KDM1B</i>	intron
rs429158	6	18188091	C	T	0,184	-0,4245	0,0608	2,89E-12	0,9861	<i>KDM1B</i>	ekson
rs1207042	6	18189240	C	T	0,184	-0,4246	0,0608	2,89E-12	0,9854	<i>KDM1B</i>	intron
rs66697834	6	18187258	A	AT	0,186	-0,4230	0,0607	3,14E-12	0,9850	<i>KDM1B</i>	intron
rs7741737	6	18184545	A	G	0,817	0,4225	0,0607	3,36E-12	0,9930	<i>KDM1B</i>	intron
rs10949485	6	18182867	G	T	0,817	0,4219	0,0606	3,41E-12	0,9957	<i>KDM1B</i>	intron
rs4712328	6	18175464	T	C	0,815	0,4208	0,0605	3,54E-12	0,9933	<i>KDM1B</i>	intron
rs187976596	6	17746015	G	T	0,019	-1,1313	0,1820	5,05E-10	0,9115	IR	
rs7740550	6	18183783	A	G	0,726	0,3416	0,0550	5,24E-10	0,9590	<i>KDM1B</i>	intron
rs9477664	6	18190957	T	C	0,110	-0,4721	0,0781	1,48E-09	0,9745	<i>KDM1B</i>	intron
rs72840608	6	18186591	G	A	0,109	-0,4714	0,0781	1,59E-09	0,9828	<i>KDM1B</i>	intron
rs58897247	6	18180584	G	T	0,108	-0,4680	0,0777	1,70E-09	0,9959	<i>KDM1B</i>	intron
rs58600716	6	18177411	C	T	0,108	-0,4679	0,0777	1,70E-09	0,9949	<i>KDM1B</i>	intron
rs60761025	6	18179270	A	T	0,108	-0,4680	0,0777	1,71E-09	0,9955	<i>KDM1B</i>	intron
rs6927693	6	18179110	G	A	0,108	-0,4680	0,0777	1,71E-09	0,9955	<i>KDM1B</i>	intron
rs6904025	6	18178858	A	G	0,108	-0,4679	0,0777	1,71E-09	0,9954	<i>KDM1B</i>	intron
rs2518469	6	18153330	A	T	0,532	0,2929	0,0490	2,18E-09	0,9600	<i>TPMT</i>	intron
rs6905751	6	18200385	G	A	0,111	-0,4626	0,0784	3,54E-09	0,9566	<i>KDM1B</i>	intron
rs214600	6	18207333	C	T	0,277	-0,3227	0,0548	3,98E-09	0,9438	<i>KDM1B</i>	intron
rs214601	6	18207236	A	G	0,277	-0,3227	0,0548	3,98E-09	0,9441	<i>KDM1B</i>	intron
rs214593	6	18208936	T	C	0,258	-0,3340	0,0572	5,16E-09	0,9023	<i>KDM1B</i>	intron
rs67711903	6	18178480	A	AT	0,127	-0,4194	0,0718	5,24E-09	0,9959	<i>KDM1B</i>	intron
rs12206891	6	18180005	T	C	0,127	-0,4203	0,0720	5,42E-09	0,9933	<i>KDM1B</i>	intron
rs214598	6	18207876	C	G	0,258	-0,3286	0,0564	5,76E-09	0,9396	<i>KDM1B</i>	intron

rs214596	6	18208319	A	G	0,259	-0,3291	0,0568	6,90E-09	0,9214	<i>KDM1B</i>	intron
rs214595	6	18208580	C	T	0,260	-0,3279	0,0570	8,65E-09	0,9117	<i>KDM1B</i>	intron
rs70974710	6	18190383	GAAA	GAAAA	0,106	-0,4572	0,0795	8,79E-09	0,9785	<i>KDM1B</i>	intron
rs214594	6	18208774	A	C	0,261	-0,3275	0,0571	9,63E-09	0,9056	<i>KDM1B</i>	intron
rs72840605	6	18181638	C	T	0,105	-0,4517	0,0788	9,84E-09	0,9992	<i>KDM1B</i>	intron
rs143343282	6	18176795	A	C	0,106	-0,4518	0,0789	1,01E-08	0,9957	<i>KDM1B</i>	intron
rs147981051	6	18176796	A	C	0,106	-0,4518	0,0789	1,01E-08	0,9957	<i>KDM1B</i>	intron
rs112230930	6	18176718	G	C	0,106	-0,4518	0,0789	1,01E-08	0,9957	<i>KDM1B</i>	intron
rs138907444	6	18174085	T	C	0,105	-0,4521	0,0791	1,09E-08	0,9901	<i>KDM1B</i>	intron
rs55801031	6	18166260	A	T	0,106	-0,4510	0,0790	1,13E-08	0,9868	<i>KDM1B</i>	intron
rs12665749	6	18181374	G	A	0,105	-0,4509	0,0792	1,26E-08	0,9897	<i>KDM1B</i>	intron
rs140242930	6	18174473	CT	C	0,106	-0,4466	0,0790	1,55E-08	0,9907	<i>KDM1B</i>	intron
rs72840615	6	18198105	T	C	0,107	-0,4489	0,0796	1,68E-08	0,9639	<i>KDM1B</i>	intron
rs214603	6	18206051	C	T	0,325	-0,2879	0,0516	2,34E-08	0,9421	<i>KDM1B</i>	intron
rs12207405	6	18181764	G	A	0,124	-0,4037	0,0726	2,71E-08	0,9990	<i>KDM1B</i>	intron
rs12208906	6	18181892	C	T	0,124	-0,4037	0,0726	2,72E-08	0,9987	<i>KDM1B</i>	intron
rs12664214	6	18181345	T	C	0,124	-0,4033	0,0726	2,78E-08	1,0000	<i>KDM1B</i>	intron
rs13216461	6	18124204	T	C	0,669	0,2880	0,0519	2,86E-08	0,9567	<i>TPMT</i>	3'-UTR
rs2842941	6	18150514	G	C	0,553	0,2669	0,0482	3,01E-08	0,9662	<i>TPMT</i>	intron
rs35237970	6	18142308	G	A	0,554	0,2676	0,0486	3,59E-08	0,9524	<i>TPMT</i>	intron
rs9367980	6	18131464	A	C	0,729	0,2896	0,0531	4,99E-08	1,0000	<i>TPMT</i>	intron
rs2842948	6	18133256	A	G	0,729	0,2847	0,0535	1,03E-07	0,9928	<i>TPMT</i>	intron
rs6459594	6	18126484	T	C	0,729	0,2842	0,0538	1,29E-07	0,9797	<i>TPMT</i>	3'-UTR
rs2842935	6	18140175	C	T	0,730	0,2813	0,0539	1,83E-07	0,9827	<i>TPMT</i>	intron
rs2842949	6	18134021	A	C	0,730	0,2808	0,0538	1,84E-07	0,9827	<i>TPMT</i>	intron
rs2842937	6	18140732	A	G	0,702	0,2762	0,0531	1,97E-07	0,9601	<i>TPMT</i>	intron
rs11390495	6	18134692	CA	C	0,731	0,2792	0,0540	2,36E-07	0,9827	<i>TPMT</i>	intron
rs2842936	6	18140250	C	T	0,698	0,2722	0,0527	2,46E-07	0,9733	<i>TPMT</i>	intron
rs5874629	6	18127855	TA	T	0,720	0,2705	0,0537	4,71E-07	0,9649	<i>TPMT</i>	3'-UTR
rs34563390	6	18104109	AAC	A	0,417	0,2546	0,0507	5,02E-07	0,9398	IR	
rs396679	16	62662304	C	T	0,733	0,2707	0,0541	5,52E-07	0,9987	IR	
rs365576	16	62656173	C	T	0,723	0,2637	0,0536	8,52E-07	0,9828	IR	
rs1493982	1	83068682	C	T	0,875	-0,3549	0,0721	8,58E-07	1,0000	IR	
rs9477630	6	18118098	A	G	0,442	0,2353	0,0481	9,84E-07	1,0000	<i>NHLRC1</i>	3'-UTR
rs7761743	6	18104840	A	G	0,442	0,2356	0,0486	1,22E-06	0,9814	IR	
rs202125962	6	18575682	AT	A	0,023	-0,7889	0,1626	1,23E-06	0,9198	<i>MIR548A1</i>	ncRNA
rs34177899	6	18106106	T	TA	0,443	0,2353	0,0485	1,26E-06	0,9825	IR	

rs11758925	6	18117868	A	G	0,443	0,2336	0,0482	1,26E-06	0,9966	<i>NHLRC1</i>	3'-UTR
rs3898137	6	18147780	A	G	0,462	0,2401	0,0496	1,31E-06	0,9691	<i>TPMT</i>	intron
rs6915893	6	18110556	T	C	0,444	0,2343	0,0485	1,37E-06	0,9861	IR	
rs12209493	6	18111157	A	G	0,444	0,2342	0,0485	1,37E-06	0,9868	IR	
rs10949483	6	18122506	A	G	0,444	0,2334	0,0483	1,38E-06	0,9909	<i>NHLRC1</i>	ekson
rs28385613	6	18142970	A	T	0,462	0,2404	0,0498	1,38E-06	0,9649	<i>TPMT</i>	intron
rs12189658	6	18103337	A	T	0,443	0,2343	0,0486	1,41E-06	0,9809	IR	
rs4294009	6	18106076	G	T	0,443	0,2345	0,0486	1,41E-06	0,9794	IR	
rs4074444	6	18106489	G	A	0,444	0,2345	0,0486	1,43E-06	0,9819	IR	
rs1908230	1	83076687	C	T	0,873	-0,3436	0,0715	1,53E-06	0,9994	IR	
rs4662151	1	83086577	A	C	0,873	-0,3430	0,0714	1,57E-06	0,9999	IR	
rs10782790	1	83087776	T	C	0,873	-0,3430	0,0714	1,57E-06	1,0000	IR	
rs56744128	9	77248731	G	A	0,241	-0,2694	0,0564	1,77E-06	0,9917	<i>RORB</i>	intron
rs118131818	8	138751720	C	T	0,252	0,2640	0,0555	1,94E-06	0,9447	IR	
rs923878	1	83094755	A	G	0,874	-0,3433	0,0721	1,95E-06	0,9801	IR	
rs10993282	9	97412037	C	T	0,113	-0,3532	0,0742	1,96E-06	1,0000	IR	
6:18277666	6	18277666	GAAGAAGGTTCTTCCATAC	G	0,012	-1,0315	0,2172	2,04E-06	0,9876	<i>Y_RNA</i>	ncRNA
rs193176004	6	18277659	A	T	0,012	-1,0314	0,2172	2,04E-06	0,9875	<i>Y_RNA</i>	ncRNA
rs17691614	9	77245873	G	A	0,241	-0,2677	0,0564	2,09E-06	0,9934	<i>RORB</i>	intron
rs4588678	6	18119477	T	C	0,455	0,2271	0,0481	2,33E-06	0,9911	<i>NHLRC1</i>	3'-UTR
rs12199316	6	18123502	G	C	0,456	0,2270	0,0482	2,49E-06	0,9868	<i>NHLRC1</i>	5'-UTR
rs9477631	6	18123772	G	A	0,456	0,2265	0,0482	2,66E-06	0,9855	<i>TPMT</i>	3'-UTR
rs7744541	6	18104700	A	T	0,457	0,2280	0,0487	2,85E-06	0,9781	IR	
rs17613537	9	77250488	A	G	0,241	-0,2634	0,0565	3,17E-06	0,9836	<i>RORB</i>	intron
rs387265	16	62663750	A	T	0,724	0,2482	0,0533	3,29E-06	0,9959	IR	
rs62569153	9	77251087	A	G	0,241	-0,2631	0,0566	3,36E-06	0,9807	<i>RORB</i>	intron
rs6921836	6	18104276	A	C	0,457	0,2261	0,0487	3,40E-06	0,9794	IR	
rs6920558	6	18104322	A	G	0,457	0,2261	0,0487	3,40E-06	0,9795	IR	
rs150109826	11	11834728	CAAATAAAT	C	0,010	-1,0991	0,2404	4,82E-06	0,9732	IR	
rs71002301	6	18104552	T	TA	0,455	0,2223	0,0487	4,96E-06	0,9777	IR	
rs10993244	9	97317540	G	C	0,116	-0,3447	0,0755	4,99E-06	0,9406	<i>FBP2</i>	3'-UTR
rs288603	16	62672079	C	T	0,713	0,2401	0,0527	5,15E-06	0,9926	IR	
rs10107846	8	138757020	A	C	0,287	0,2410	0,0530	5,39E-06	0,9526	IR	
rs11998973	9	97314815	A	T	0,116	-0,3437	0,0756	5,41E-06	0,9384	<i>PCAT7</i>	5'-UTR
rs13097015	3	14992135	T	C	0,097	0,3765	0,0830	5,76E-06	0,9848	<i>FGD5-AS1</i>	ncRNA
rs35741051	3	15028462	A	T	0,098	0,3721	0,0827	6,79E-06	0,9876	<i>NR2C2</i>	intron

rs13097792	3	14999621	A	G	0,098	0,3716	0,0827	7,07E-06	0,9882	NR2C2	intron
rs13098326	3	14999938	A	G	0,098	0,3716	0,0827	7,08E-06	0,9882	NR2C2	intron
rs13045713	20	4847211	G	C	0,226	0,2554	0,0569	7,12E-06	0,9606	SLC23A2	intron
rs35287134	3	15025324	G	C	0,098	0,3713	0,0828	7,25E-06	0,9877	NR2C2	intron
6:18288481	6	18288481	A	G	0,014	-0,9424	0,2101	7,30E-06	0,9758	IR	
6:18288487	6	18288487	G	A	0,014	-0,9424	0,2101	7,30E-06	0,9758	IR	
rs118108773	6	18330918	T	C	0,014	-0,9367	0,2090	7,40E-06	0,9647	IR	
rs7605911	2	167702100	A	G	0,226	-0,2587	0,0578	7,55E-06	1,0000	IR	
rs148577186	6	18340549	T	C	0,014	-0,9359	0,2090	7,56E-06	0,9578	IR	
rs369183792	3	15026051	T	TAAAG	0,097	0,3720	0,0831	7,59E-06	0,9859	NR2C2	intron
6:18288479	6	18288479	G	A	0,014	-0,9308	0,2083	7,85E-06	0,9688	IR	
rs13070481	3	15007417	G	C	0,098	0,3702	0,0829	7,99E-06	0,9875	NR2C2	intron
rs71308118	3	15021013	G	A	0,098	0,3698	0,0828	8,02E-06	0,9889	NR2C2	intron
rs13070935	3	15007714	C	A	0,098	0,3700	0,0829	8,06E-06	0,9875	NR2C2	intron
rs34025016	3	15010707	C	T	0,098	0,3699	0,0829	8,08E-06	0,9879	NR2C2	intron
rs7643659	3	15004531	T	C	0,098	0,3700	0,0829	8,09E-06	0,9872	NR2C2	intron
rs34771866	3	15017592	A	T	0,098	0,3696	0,0829	8,16E-06	0,9887	NR2C2	intron
rs71919792	3	15022065	T	TAAGA	0,097	0,3706	0,0832	8,36E-06	0,9867	NR2C2	intron
rs7611235	3	15004530	A	T	0,098	0,3700	0,0830	8,37E-06	0,9849	NR2C2	intron
rs9526097	13	46219331	G	A	0,471	0,2106	0,0473	8,43E-06	0,9744	IR	
rs12342274	9	97280338	T	C	0,116	-0,3369	0,0759	9,11E-06	0,9288	IR	
rs12340469	9	97278689	C	T	0,116	-0,3369	0,0759	9,12E-06	0,9287	RP11-533K9	pseudogeen
rs6910196	6	18102507	A	C	0,383	0,2243	0,0506	9,30E-06	0,9643	IR	
rs35950359	13	46235125	CA	C	0,483	0,2118	0,0479	9,63E-06	0,9741	IR	
rs72752169	15	86746994	T	C	0,166	-0,2808	0,0635	9,79E-06	0,9915	AGBL1	intron
rs35996969	9	97276900	C	T	0,116	-0,3365	0,0761	9,83E-06	0,9251	RP11-533K9	pseudogeen
rs12201199	6	18139802	T	A	0,041	-1,5894	0,1233	5,33E-38	0,9181	TPMT	intron

Kr. – kromosoom; EAF – efektiivseleleli sagedus; Imput. info – imputeerimise skoor (väärtus 1 tähendab genotüpiseeritud markerit).

Lisa 2. Uuringu 2 (TPMT substraadiks 6-MP) tulemused.

Marker	Kr.	Positsioon	Efektiivsus	Teine alleel	EAF	BETA	SE	p-väärtus	Imput. info	Geen	Regioon
rs77095250	6	18157866	C	T	0,027	-1,5542	0,1586	1,16E-22	0,9077	TPMT	5'-UTR
rs76835453	6	18157625	C	T	0,027	-1,5542	0,1586	1,16E-22	0,9077	TPMT	5'-UTR
rs201170640	6	18152819	T	TTTC	0,027	-1,5535	0,1586	1,18E-22	0,9089	TPMT	intron
rs79325856	6	18161232	G	A	0,027	-1,5547	0,1587	1,18E-22	0,9049	KDM1B	intron
rs79050301	6	18152190	C	T	0,027	-1,5535	0,1586	1,18E-22	0,9091	TPMT	intron
rs76574179	6	18152540	C	G	0,027	-1,5534	0,1586	1,21E-22	0,9074	TPMT	intron
rs77032929	6	18152293	C	T	0,027	-1,5534	0,1586	1,22E-22	0,9074	TPMT	intron
rs145835309	6	18151571	C	T	0,027	-1,5533	0,1586	1,22E-22	0,9076	TPMT	intron
rs75221067	6	18148665	C	G	0,027	-1,5528	0,1586	1,23E-22	0,9085	TPMT	intron
rs3931660	6	18149105	T	A	0,027	-1,5529	0,1586	1,23E-22	0,9083	TPMT	intron
rs17839845	6	18147958	A	C	0,027	-1,5527	0,1586	1,23E-22	0,9086	TPMT	intron
rs150981757	6	18154526	C	CACAA	0,027	-1,5532	0,1586	1,24E-22	0,9067	TPMT	intron
rs115368110	6	18146411	T	C	0,027	-1,5524	0,1586	1,24E-22	0,9091	TPMT	intron
rs11967496	6	18145750	C	T	0,027	-1,5523	0,1586	1,24E-22	0,9093	TPMT	intron
rs11964408	6	18145907	T	C	0,027	-1,5523	0,1586	1,25E-22	0,9092	TPMT	intron
rs11969221	6	18145891	A	G	0,027	-1,5523	0,1586	1,25E-22	0,9093	TPMT	intron
rs11966998	6	18145733	G	T	0,027	-1,5523	0,1586	1,25E-22	0,9093	TPMT	intron
rs7760301	6	18144905	T	C	0,027	-1,5522	0,1586	1,25E-22	0,9096	TPMT	intron
rs7775626	6	18144521	T	A	0,027	-1,5521	0,1585	1,25E-22	0,9097	TPMT	intron
rs141831144	6	18144098	A	AG	0,027	-1,5518	0,1585	1,26E-22	0,9102	TPMT	intron
rs76969503	6	18143512	T	C	0,027	-1,5514	0,1585	1,27E-22	0,9109	TPMT	intron
rs146389100	6	18142802	CCAAA	C	0,027	-1,5509	0,1585	1,29E-22	0,9117	TPMT	intron
rs114994345	6	18142288	T	C	0,027	-1,5505	0,1584	1,30E-22	0,9124	TPMT	intron
rs199696756	6	18140894	GAC	G	0,026	-1,5489	0,1585	1,49E-22	0,9221	TPMT	intron
rs76244256	6	18140563	T	C	0,026	-1,5478	0,1584	1,53E-22	0,9234	TPMT	intron
rs78846846	6	18132495	A	G	0,026	-1,5429	0,1582	1,79E-22	0,9295	TPMT	intron
rs1142345	6	18130918	C	T	0,026	-1,5433	0,1582	1,80E-22	0,9288	TPMT	ekson
6:18134687	6	18134687	T	C	0,026	-1,5423	0,1581	1,80E-22	0,9298	TPMT	intron
rs77339739	6	18135520	C	T	0,026	-1,5422	0,1581	1,80E-22	0,9299	TPMT	intron
rs77134359	6	18135341	A	G	0,026	-1,5422	0,1581	1,80E-22	0,9299	TPMT	intron
rs75379431	6	18128481	G	T	0,026	-1,5437	0,1583	1,87E-22	0,9267	TPMT	3'-UTR
rs78631584	6	18128201	G	C	0,026	-1,5437	0,1584	1,88E-22	0,9264	TPMT	3'-UTR
rs115306927	6	18126938	T	A	0,026	-1,5439	0,1584	1,93E-22	0,9251	TPMT	3'-UTR
rs4348322	6	18125603	G	A	0,026	-1,5440	0,1585	1,99E-22	0,9235	TPMT	3'-UTR

rs145991169	6	18125063	T	TAAAC	0,026	-1,5406	0,1586	2,63E-22	0,9191	TPMT	3'-UTR
rs55835807	6	18124962	G	C	0,026	-1,5406	0,1586	2,63E-22	0,9189	TPMT	3'-UTR
rs73724422	6	18124230	C	T	0,026	-1,5408	0,1587	2,70E-22	0,9178	TPMT	3'-UTR
rs12111366	6	18122942	C	G	0,026	-1,5409	0,1587	2,81E-22	0,9158	NHLRC1	5'-UTR
rs10949482	6	18121314	T	C	0,027	-1,5411	0,1589	2,98E-22	0,9134	NHLRC1	3'-UTR
rs10949481	6	18121029	T	A	0,027	-1,5411	0,1589	3,00E-22	0,9131	NHLRC1	3'-UTR
rs10949480	6	18121024	A	G	0,027	-1,5411	0,1589	3,00E-22	0,9131	NHLRC1	3'-UTR
rs144540809	6	18120564	CCATAAACATGTAA	C	0,027	-1,5412	0,1589	3,04E-22	0,9125	NHLRC1	3'-UTR
rs55738521	6	18120554	T	C	0,027	-1,5411	0,1589	3,05E-22	0,9125	NHLRC1	3'-UTR
rs75289348	6	18120484	A	G	0,027	-1,5411	0,1589	3,05E-22	0,9124	NHLRC1	3'-UTR
rs77353348	6	18120400	T	C	0,027	-1,5411	0,1589	3,06E-22	0,9123	NHLRC1	3'-UTR
rs75407001	6	18120293	T	C	0,027	-1,5411	0,1589	3,07E-22	0,9122	NHLRC1	3'-UTR
rs79867975	6	18120156	T	C	0,027	-1,5415	0,1590	3,08E-22	0,9114	NHLRC1	3'-UTR
rs149086139	6	18120172	T	TA	0,027	-1,5412	0,1589	3,08E-22	0,9120	NHLRC1	3'-UTR
rs143093668	6	18114246	T	C	0,027	-1,5090	0,1581	1,36E-21	0,9032	IR	
rs146929633	6	18114442	G	A	0,027	-1,5085	0,1580	1,37E-21	0,9036	IR	
rs74370978	6	18114687	T	G	0,027	-1,5078	0,1580	1,38E-21	0,9041	IR	
rs73726541	6	18120013	G	A	0,027	-1,4987	0,1571	1,46E-21	0,9136	NHLRC1	3'-UTR
rs77011815	6	18116426	T	C	0,027	-1,5032	0,1576	1,46E-21	0,9077	IR	
rs79409033	6	18116478	T	C	0,027	-1,5030	0,1576	1,46E-21	0,9079	IR	
rs79664320	6	18116485	A	G	0,027	-1,5030	0,1576	1,47E-21	0,9078	IR	
rs58413089	6	18119688	A	T	0,027	-1,4987	0,1571	1,47E-21	0,9132	NHLRC1	3'-UTR
rs59065902	6	18119510	G	T	0,027	-1,4987	0,1572	1,48E-21	0,9130	NHLRC1	3'-UTR
rs59662522	6	18119458	G	A	0,027	-1,4987	0,1572	1,48E-21	0,9129	NHLRC1	3'-UTR
rs73726540	6	18118898	T	C	0,027	-1,4987	0,1572	1,51E-21	0,9122	NHLRC1	3'-UTR
rs73726539	6	18118764	T	C	0,027	-1,4986	0,1572	1,52E-21	0,9121	NHLRC1	3'-UTR
rs73726538	6	18118725	G	A	0,027	-1,4987	0,1572	1,52E-21	0,9120	NHLRC1	3'-UTR
rs73726537	6	18118712	T	C	0,027	-1,4987	0,1572	1,52E-21	0,9120	NHLRC1	3'-UTR
rs73726536	6	18118540	G	A	0,027	-1,4986	0,1572	1,53E-21	0,9118	NHLRC1	3'-UTR
rs114615109	6	18117820	A	C	0,027	-1,4994	0,1573	1,54E-21	0,9107	NHLRC1	3'-UTR
rs73726535	6	18118392	T	C	0,027	-1,4986	0,1572	1,54E-21	0,9116	NHLRC1	3'-UTR
rs150772783	6	18117955	G	C	0,027	-1,4990	0,1573	1,54E-21	0,9110	NHLRC1	3'-UTR
rs12201199	6	18139802	T	A	0,041	-1,0517	0,1216	5,36E-18	0,9587	TPMT	intron
rs150694038	6	18123462	A	AC	0,073	-0,6272	0,0963	7,31E-11	0,9191	NHLRC1	5'-UTR
rs115931931	6	18122526	G	A	0,058	-0,7060	0,1092	1,03E-10	0,9002	NHLRC1	ekson
rs13171357	5	36695056	A	G	0,337	0,2851	0,0521	4,47E-08	0,9740	CTD-2353F22	ncRNA
rs6887423	5	36696501	C	T	0,497	-0,2570	0,0485	1,18E-07	0,9819	CTD-2353F22	ncRNA

rs17585785	5	36695331	G	A	0,498	-0,2568	0,0486	1,29E-07	0,9780	CTD-2353F22	ncRNA
12:40055136	12	40055136	G	A	0,027	0,7977	0,1556	2,98E-07	0,9496	SLC2A13	intron
rs56162483	5	36710830	G	C	0,476	-0,2469	0,0484	3,42E-07	0,9896	CTD-2353F22	ncRNA
rs149428055	8	86951194	A	G	0,082	0,4544	0,0902	4,65E-07	0,9700	CTA-392E5	ncRNA
rs148413525	8	86930700	T	C	0,083	0,4458	0,0895	6,43E-07	0,9773	CTA-392E5	ncRNA
rs118009719	8	86928036	A	C	0,083	0,4457	0,0895	6,44E-07	0,9773	CTA-392E5	ncRNA
rs1122900	5	36689181	C	A	0,528	-0,2384	0,0481	7,11E-07	0,9767	CTD-2353F22	ncRNA
rs4081970	8	86554933	G	A	0,082	0,4584	0,0926	7,37E-07	0,9288	REXO1L8P	3'-UTR
rs117134244	8	86841484	A	T	0,084	0,4303	0,0884	1,14E-06	0,9885	REXO1L6P	5'-UTR
rs11672362	19	44149900	T	C	0,016	0,9342	0,1930	1,30E-06	0,9108	PLAUR	3'-UTR
rs72821844	10	114123272	T	C	0,017	0,9319	0,1938	1,52E-06	0,9325	IR	
rs58205569	9	107975538	A	G	0,068	0,4529	0,0948	1,76E-06	0,9942	IR	
rs141921260	9	107975839	T	TG	0,068	0,4529	0,0948	1,78E-06	0,9937	IR	
rs35008067	9	107976375	A	G	0,068	0,4523	0,0948	1,83E-06	0,9931	IR	
rs62104184	2	542879	A	G	0,120	0,3726	0,0783	1,98E-06	0,9163	AC093326	5'-UTR
rs142678663	9	107974213	G	GCTGA	0,068	0,4515	0,0950	2,01E-06	0,9963	IR	
rs60566436	9	107979186	T	C	0,068	0,4512	0,0952	2,12E-06	0,9853	IR	
rs143280402	10	114131536	G	A	0,018	0,9030	0,1910	2,27E-06	0,9283	ACSL5	5'-UTR
rs111345722	10	114139024	A	G	0,022	0,7972	0,1692	2,46E-06	0,9637	ACSL5	intron
rs9112	5	121518309	A	G	0,367	0,2324	0,0494	2,56E-06	1,0000	CTC-441N14	3'-UTR
rs73935020	19	44147348	A	T	0,013	0,9995	0,2135	2,85E-06	0,9199	PLAUR	3'-UTR
rs35108535	8	86541110	CT	C	0,091	0,3994	0,0854	2,95E-06	0,9824	IR	
rs34425682	8	86543355	C	CCCTT	0,076	0,4498	0,0966	3,20E-06	0,9132	IR	
rs17129769	10	114168669	A	C	0,022	0,7849	0,1686	3,24E-06	0,9607	ACSL5	intron
rs2270235	7	21051467	A	G	0,080	0,4245	0,0913	3,29E-06	0,9479	LINC01162	intron
rs369686924	2	233701000	T	A	0,028	0,6984	0,1507	3,55E-06	0,9692	GIGYF2	intron
rs72742556	9	107971996	T	G	0,080	0,4224	0,0911	3,56E-06	0,9489	IR	
rs17129773	10	114174813	G	C	0,022	0,7771	0,1681	3,80E-06	0,9587	ACSL5	intron
rs56038114	5	36683801	C	T	0,525	-0,2241	0,0485	3,87E-06	0,9601	CTD-2353F22	ncRNA
rs62036957	16	4064637	C	G	0,916	-0,4095	0,0890	4,18E-06	0,9785	ADCY9	intron
rs117081398	10	79667078	C	T	0,019	0,8043	0,1760	4,90E-06	0,9361	DLG5	intron
rs72617183	2	233728063	C	T	0,027	0,6855	0,1508	5,47E-06	0,9923	GIGYF2	3'-UTR
rs2241979	2	233714592	G	A	0,027	0,6853	0,1508	5,49E-06	0,9924	GIGYF2	intron
rs369860388	2	233701046	T	A	0,027	0,6852	0,1508	5,52E-06	0,9912	GIGYF2	intron
rs113897697	2	233685798	G	C	0,027	0,6849	0,1508	5,57E-06	0,9913	GIGYF2	intron
rs56039629	5	36683903	T	C	0,512	-0,2206	0,0486	5,57E-06	0,9579	CTD-2353F22	ncRNA
rs72617184	2	233736981	C	G	0,027	0,6847	0,1508	5,59E-06	0,9915	C2orf82	intron

rs12623408	2	233569951	G	A	0,028	0,6914	0,1524	5,68E-06	0,9501	GIGYF2	intron
rs12619228	2	233678473	A	G	0,027	0,6835	0,1508	5,84E-06	0,9865	GIGYF2	intron
rs3816335	2	233671530	G	A	0,027	0,6833	0,1508	5,86E-06	0,9860	GIGYF2	intron
rs201213759	2	233668787	A	ATT	0,027	0,6832	0,1508	5,88E-06	0,9859	GIGYF2	intron
rs72617178	2	233586361	T	C	0,028	0,6874	0,1517	5,88E-06	0,9658	GIGYF2	intron
rs72617179	2	233592613	T	C	0,027	0,6843	0,1512	5,99E-06	0,9760	GIGYF2	intron
rs72617181	2	233630175	C	A	0,027	0,6819	0,1507	6,05E-06	0,9836	GIGYF2	intron
rs143786443	2	233596640	T	TAAAC	0,027	0,6831	0,1510	6,05E-06	0,9802	GIGYF2	intron
rs72617180	2	233597663	A	G	0,027	0,6829	0,1509	6,06E-06	0,9810	GIGYF2	intron
rs72617185	2	233777204	T	C	0,029	0,6700	0,1482	6,17E-06	0,9139	NGEF	intron
rs72617182	2	233648741	T	C	0,028	0,6758	0,1503	6,89E-06	0,9844	GIGYF2	intron
rs56256473	5	36683920	C	G	0,095	-0,3882	0,0863	6,93E-06	0,9052	CTD-2353F22	ncRNA
rs4973572	2	233778387	G	T	0,029	0,6645	0,1479	7,06E-06	0,9155	NGEF	intron
rs72617186	2	233778846	C	G	0,029	0,6642	0,1479	7,09E-06	0,9172	NGEF	intron
rs1423678	5	36673238	A	G	0,490	0,2190	0,0492	8,66E-06	0,9245	CTD-2353F22	ncRNA
rs11379548	7	64853551	TA	T	0,168	0,3001	0,0676	8,90E-06	0,9468	ZNF92	intron
rs58450787	2	233782161	A	G	0,030	0,6521	0,1472	9,41E-06	0,9248	NGEF	intron
rs12929944	16	4065184	T	C	0,080	0,4176	0,0943	9,56E-06	0,9190	ADCY9	intron
rs72617187	2	233782433	T	C	0,030	0,6512	0,1471	9,61E-06	0,9254	NGEF	intron
rs71388556	16	4070872	T	C	0,079	0,4214	0,0953	9,79E-06	0,9066	ADCY9	intron

Kr. – kromosoom; EAF – efekti alleeli sagedus; Imput. info – imputeerimise skoor (väärtus 1 tähendab genotüpiseeritud markerit).

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mattis Jaama (sünnikuupäev: 28.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Tiopuriinmetüültransferaasi geneetiliste markerite ülegenoomne assotsiatsiooniuuring, mille juhendajad on Lili Milani ja Riin Tamm,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015